

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos
en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de
Lima Cercado**

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutica

AUTORAS

Giuliana Patricia Azañero Rodríguez

Magna Arsenia Chiroque Limaymanta

ASESOR

Mirtha Alcarraz Roque

Lima – Perú

2010

A nuestros padres por apoyarnos siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la oportunidad de vivir el día a día y ser mejores personas.

A nuestra Alma Mater Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a nuestra querida Facultad de Farmacia y Bioquímica.

A la Dra. Mirtha Roque Alcarraz por habernos guiado, darnos la oportunidad de realizar la presente investigación al brindarnos las instalaciones del Centro de Control Analítico (CCA) de nuestra facultad.

A la Jefa de Control de Calidad de laboratorios Pharmed Corporation S.A.C por habernos facilitado las instalaciones del área de microbiología.

A los doctores miembros del jurado calificador: Dr. José Irely Namijira, Dra. Carmen López, Dra. Teresa Gallardo y Dra. Nancy Lozano por haber sido nuestros maestros y guías al ayudarnos a concluir exitosamente el presente trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II- GENERALIDADES	3
2.1- Antimicrobianos más utilizados en medicina veterinaria avícola	4
2.2- Fines de utilización de antimicrobianos en medicina veterinaria avícola	5
A. Fines Profilácticos	5
B. Fines Terapéuticos	5
C. Como Promotores de Crecimiento	5
2.3- Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal	7
2.3.1 Definición	7
2.3.2 Efectos Toxicológicos	8
2.3.3 Aspectos toxicológicos	9
2.4- Características de los métodos de análisis de residuos de medicamentos veterinarios	11
2.5- Métodos utilizados en el análisis	12
2.5.1 Método microbiológico de difusión de las cuatro placas	12
2.5.2 Método cuantitativo por cromatografía líquida de alta resolución	13
III- PARTE EXPERIMENTAL	16
3.1- Muestreo y Muestra	16
3.2- Método Microbiológico de Detección	16

3.2.1- Principio del Ensayo	16
3.2.2- Descripción del Ensayo	16
3.2.3- Procedimiento del Ensayo	18
A. Consideraciones Generales	18
B. Equipamiento y Materiales	18
C. Preparación de Medios y Soluciones Patrón	19
D. Ensayos previos al Análisis	21
E. Preparación de la muestra de ensayo	25
F. Detección de Residuos	25
3.3- CONSIDERACIONES PARA LA LECTURA DE LOS DISCOS	29
3.4- MÉTODO INSTRUMENTAL DE CUANTIFICACIÓN	29
3.4.1- Fundamento del Método	29
3.4.2- Equipamiento y Materiales	30
3.4.3- Antimicrobianos por cuantificar	30
A. Sulfametoxazol por HPLC	30
B. Ampicilina por HPLC	32
C. Norfloxacinó por HPLC	34
D. Ciprofloxacino por HPLC	35
3.5- RESULTADOS	37

IV- DISCUSIÓN	49
V- CONCLUSIONES	51
VI- RECOMENDACIONES	52
VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ANEXOS

Anexo I	:	Glosario de términos.
Anexo II	:	Lista de Sustancias Farmacológicamente Activas cuyos LMR se han establecido. Reglamento del Consejo Europeo 2758/99 (modificación del 23.12.99 del R2377/90).
Anexo III	:	Certificados Analíticos de las bacterias utilizadas.
Anexo IV	:	Certificados Analíticos de los estándares utilizados.
Anexo V	:	Fórmula del Agar utilizado en el análisis.
Anexo VI	:	Fotos de la realización del análisis.
Anexo VII	:	Cuadro de zonas de inhibición (mm) por microorganismos, pH y cantidad de muestras por zonas de muestreo.
Anexo VIII	:	Reportes de Cuantificación de Sulfametoxazol, Norfloxacino y Ciprofloxacino.

ABREVIATURAS

- ATCC	:	Colección Americana de Cultivos Tipo.
- APAVIC	:	Asociación Peruana de Avicultura.
- CCE	:	Comisión de las Comunidades Europeas.
- FS	:	Factor de Seguridad.
- FDA	:	Administración de Alimentos y Drogas
- FAO	:	Organización de Agricultura y Alimentos.
- IDA	:	Ingesta Diaria Admisible.
- IUPAC	:	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
- LMR	:	Límite máximo de residuo.
- NOEL	:	Nivel sin Efectos Adversos Observables.
- OMS	:	Organización Mundial de la Salud.
- SENASA	:	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
- TSA	:	Agar Trypticase Soja.
- UE	:	Unión Europea.

RESUMEN

El uso de antimicrobianos como tratamiento terapéutico o profiláctico en animales de consumo masivo, como aves de corral (pollos), actualmente es de vital importancia para la industria avícola ya que permite promover el crecimiento y crianza intensiva de dichos animales así como garantizar productos sanos y de “calidad”, pero cuando se utilizan de forma abusiva sin atender a los principios de la buena practica veterinaria, la presencia de residuos en los alimentos representa un grave riesgo para la salud pública ya que podrían generar en los consumidores resistencia bacteriana y alergias provocando problemas médicos y veterinarios. El presente estudio, siguiendo la recomendación de las medidas de control del Consejo de las Comunidades Europeas, realizó un muestreo de carne de pollo en cuatro zonas comerciales: Mercado Central, Supermercado Metro, Mercado Eco, Mercado La Aurora en Lima cercado, donde se tomaron cinco muestras de cada mercado, teniendo un total de veinte muestras. La metodología empleada para detectar la presencia o ausencia de residuos de antibióticos tuvo como referencia el método microbiológico de difusión de las cuatro placas, para luego cuantificarlos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados obtenidos por ensayo microbiológico fueron positivos ya que se obtuvo halos de inhibición en al menos una de las placas ensayadas de cada muestra de 2mm de ancho. Por el método cuantitativo por HPLC se obtuvieron resultados que sobrepasan el Límite Máximo de Residuos (LMR) para sulfametoxazol en 75% de las muestras (mayor a 100ug/Kg de músculo), para norfloxacin en 100% de las muestras (mayor a 100 ug/Kg de músculo) y para ciprofloxacino en 50% de las muestras (mayor a 100 ug/Kg de músculo).

Palabras claves: Antimicrobianos, método microbiológico, HPLC, músculo de pollo, residuos.

ABSTRACT

The use of antimicrobials as therapeutic or prophylactic treatment in animals of n consumption, such as poultry (chicken), it is now vital to the poultry industry because it can promote growth and intensive farming of these animals and ensure healthy and "quality", but when used improperly without regard to principles of good veterinary practice, the presence of residues in food poses a serious risk to public health because consumers could develop bacterial resistance and cause allergies medical and veterinary problems. This study, following the recommendation of the control measures of the Council of the European Communities, it is carried out a sampling of chicken meat in four commercial areas: Central Market, Supermarket Metro, Eco Market, Aurora Market in Lima Cercado, where five samples were taken of each market, taking a total of twenty samples. The methodology used to detect the presence or absence of residues of antibiotics had the reference microbiological method of diffusion of the four plates, then quantified by liquid chromatography (HPLC). The results of microbiological tests were positive as halos of inhibition were obtained in at least one plate of each sample tested 2mm wide. For quantitative HPLC method, it was obtained results that exceeded the maximum residue limit (MRL) for sulfamethoxazole in 75% of samples (greater than 100ug/Kg of muscle), norfloxacin of 100% of the samples (greater than 100 ug / kg of muscle) and ciprofloxacin of 50% of the samples (greater than 100 ug / kg of muscle).

Key Words: Antimicrobials, microbiological technique, HPLC, chicken's muscle, residues.

I. INTRODUCCIÓN

Un aspecto importante en los medicamentos de uso veterinario es que deben ser seguros tanto para la especie animal al cual es destinado como para el manipulador que lo administra, para el medio ambiente sobre el que en ocasiones se aplican, para el consumidor de los alimentos de origen animal y para los microorganismos transformadores de algunos alimentos (como en los productos lácteos).¹ Si bien la utilización de medicamentos en los animales destinados al consumo humano resulta beneficiosa tanto en términos económicos como sanitarios al mejorar la rentabilidad de las explotaciones ganaderas y el bienestar animal, los residuos de esos medicamentos pueden llegar al consumidor a través de la cadena alimenticia produciéndole efectos nocivos como reacciones alérgicas resistencia bacteriana y otras formas de toxicidad aguda, así como efectos más sutiles pero con efectos notables en la salud pública, como la perturbación de la flora bacteriana intestinal.^{1,2}

Con respecto a la normativa de los antibióticos permitidos como aditivos así como los límites máximos de residuos (LMR) de antibióticos para cada alimento según especie y tejido de procedencia, la Unión Europea (UE) tiene establecido el Reglamento 2758/99¹² el cual sirve de base para algunos países que aun no poseen sus propios reglamentos acordes a su realidad no siendo el caso de Estados Unidos quien cuenta con su propio reglamento al igual que otros países de Latinoamérica como Argentina y Uruguay¹². El Perú con su organismo regulador el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) aún no cuenta con una reglamentación específica establecida, la cual pueda regir la salubridad pública con respecto a este tema¹⁶.

Por otro lado, los estudios realizados con respecto a la presencia de residuos antibióticos en músculo de animales de consumo masivo es cada vez más frecuente utilizando para ello métodos tanto microbiológicos como cuantitativos, por ejemplo: En primer lugar tenemos el método microbiológico de difusión de las cuatro placas ha sido desarrollado con el fin de detectar residuos de sustancias antibacteriales en productos de origen animal y es aplicado como método de control en los países que exportan a la Unión Europea (UE)^{3,5,12}. Este método permite detectar un amplio rango de grupos de antimicrobianos en un corto tiempo (24 horas) y con un bajo

costo además de poder ser modificado agregando placas de acuerdo a la conveniencia del análisis. Existen además otras metodologías de análisis y es mediante la utilización de kits, basados en técnicas inmunocromatográficas, para realizar determinaciones rápidas de presencia o no de antibióticos principalmente para alimentos como leche y carnes, por ejemplo el test IC-bovino ensayo de inmunocromatografía³. En segundo lugar, el análisis cuantitativo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) da con certeza la identidad del antimicrobiano así como la cantidad presente en la muestra analizada mediante picos característicos a cada sustancia y a longitudes de onda específicos. Este método es ampliamente utilizado por su sensibilidad y precisión.

Por lo anteriormente expuesto, el presente estudio tiene como objetivo el análisis de muestras representativas primero para detectar o no la presencia de residuos antibióticos en músculo esquelético de pollo teniendo como base el método microbiológico de difusión de las cuatro placas y segundo la identificación y determinación cuantitativa de dichos residuos por medio de la cromatografía líquida de alta resolución.

II. GENERALIDADES

Existen actualmente muchos estudios realizados que evidencian la presencia de residuos antibióticos en carnes de consumo masivo, así como diversos métodos para detectar y cuantificar dichos residuos por ejemplo el estudio de residuos de enrofloxacin en tejido hepático y muscular de pollos beneficiados en el municipio San Francisco del Estado Zulia, Venezuela realizado por Molero-Saras *et al*¹⁰ donde utilizaron como método, para cuantificar, la cromatografía líquida de alta resolución la cual dio resultados por encima de los límites permitidos de residuos (3810 ug/Kg de músculo pechuga) para la enrofloxacin miembro de la familia de las quinolonas uno de los grupos farmacológicos más usados en medicina avícola¹⁰ además se puede mencionar el estudio realizado por Gonzáles *et al*⁴ sobre la estabilidad de sulfametazina en carne y productos cárnicos de cerdo tratados térmicamente donde utilizaron el método por HPLC y se comprobó que la sulfametazina se mantenía estable ante diversos tratamientos térmicos por lo que es importante mantener este residuo por debajo de los límites máximos permitidos. Cabe mencionar el estudio de detección de residuos antimicrobianos en tejidos comestibles y tetraciclinas en hueso de cerdo de Medina *et al*⁸, donde utilizaron como método para detectar grupos de antimicrobianos, el método microbiológico de tres placas donde obtuvieron 66% de las muestras de hígado positivas para la placa pH 7.2 lo que quiere decir que el cerdo contenía en su mayoría sulfonamidas y para la muestra de hueso de cerdo, 81% fueron positivos lo que indicó que existía un elevado porcentaje de cerdos con residuos de tetraciclinas y sustentó además el envío frecuente al matadero de estos animales con residuos de antimicrobianos.

En nuestro país aún la investigación al respecto de este tema está en un nivel inicial por lo que es importante continuar el estudio teniendo como base los trabajos anteriormente mencionados, por ello el presente estudio trata de evidenciar la presencia de residuos de antimicrobianos en músculo de pollo de consumo masivo en nuestra población.

2.1. Antimicrobianos más utilizados en medicina veterinaria avícola:

CUADRO N° 1: Según la Asociación Peruana de Avicultura¹⁷ los antimicrobianos usados en medicina avícola son:

GRUPO FARMACOLÓGICO	ANTIMICROBIANOS
- Quinolonas	Ciprofloxacino Enrofloxacino Norfloxacino
- Fenicoles	Derivados del cloranfenicol: Tianfenicol Florfenicol
- Macrólidos y Lincosamidas	Tilosina Eritromicina Espiramicina Lincomicina
- Tetraciclinas	Oxitetraciclina Clortetraciclina Doxiciclina
- Betalactámicos	Amoxicilina Ampicilina
- Sulfamidas + Trimetoprima	Sulfadiazina Sulfametoxazol
-Amino glucósidos	Neomicina Kanamicina Gentamicina

2.2. Fines de utilización de antimicrobianos en medicina veterinaria avícola:

- a. **Fines profilácticos:** Sólo para aquellos casos en que esté demostrado su importancia para prevenir una infección; por ejemplo, en ciclos iniciales de crecimiento de animales, especialmente sensibles a agentes infecciosos muy particulares. En estos casos no deberían emplearse antimicrobianos de adquisición reciente ya que en general son menos eficaces como preventivos de infección que los ya existentes y podrían favorecer además, la aparición de resistencias^{1,2}.
- b. **Fines terapéuticos:** Esta es la forma ideal de tratamiento antimicrobiano, conociendo el germen causal. Es preferible recurrir siempre a antimicrobianos de espectro reducido para poder aumentar la eficacia del tratamiento y reducir el eventual trastorno que el antimicrobiano ejercerá sobre la flora comensal. Se recomienda únicamente la asociación de antibióticos cuando éstos presentan efectos aditivos o sinérgicos^{1,2}.

La vía de administración preferida por veterinarios, varía en función de las especies animales, aunque la alimentación mediante piensos adicionados con medicamentos es una de las más usadas a la hora de medicar en los sectores zootécnicos, también se suele utilizar el agua de consumo diario para estos fines; siendo las otras vías de administración: intramuscular, subcutánea, tópica o intravenosa².

- c. **Como promotores del crecimiento:** Desde el descubrimiento en los años 40 de que bajas concentraciones de antibióticos podían mejorar el índice de crecimiento en animales domésticos, compuestos antibacterianos se vienen utilizando ampliamente como promotores del crecimiento en producción animal. Se han usado diferentes antimicrobianos como promotores del crecimiento observándose una mejora de la conversión en los animales y una reducción de la morbilidad y mortalidad debidas a las enfermedades subclínicas y clínicas. Los antibacterianos promotores del crecimiento pertenecen a diversos grupos de antimicrobianos, no relacionados estructuralmente y ejercen su actividad antibacteriana por diversos

mecanismos. Las primeras discusiones sobre el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento tuvieron lugar en el Reino Unido en el informe Swann; condujeron a un problema de incremento de la resistencia de bacterias de origen animal y humano, particularmente la resistencia de bacterias Gram (-) (*Salmonella spp.* y *Escherichia coli*). En el Reino Unido, el informe Swann propuso que los antimicrobianos usados para la promoción del crecimiento deberían restringirse a que: (1) produzcan una diferencia que fuera económicamente significativa en el desarrollo de la producción animal, (2) tuvieran poca o incluso ninguna aplicación como agentes terapéuticos en los animales y en el hombre, y (3) no afectaran la eficacia de un fármaco terapéutico prescrito a través del desarrollo de cepas resistentes¹¹.

Los antimicrobianos promotores del crecimiento comúnmente se adicionan en el pienso o agua que consumen los pollos, pavos, cerdos y ganado vacuno; con el fin de mejorar la ganancia de peso y el índice de conversión de alimentos, los antimicrobianos se incluyen en el pienso a bajas concentraciones, en un rango entre 2,5 y 125 mg/Kg. de pienso dependiendo del agente y de las especies tratadas. Los antimicrobianos promotores del crecimiento pueden dar mejoras en la ganancia diaria de peso y en el índice de conversión de alimentos en un orden de 3-5% en pollos de engorde. Además de los beneficios económicos, las principales ventajas para los ganaderos son mayor uniformidad de crecimiento, estabilización de la flora intestinal en los animales, y mantenimiento de la salud en casos de estrés medioambiental en un grado que se puede decir que estos antimicrobianos promotores de crecimiento actúan profilácticamente, es decir reducen la morbilidad².

CUADRO N° 2: Antimicrobianos autorizados en los EE.UU. para uso en animales productores de alimentos (Nacional Academy of Sciences Committee on Drug Use in Food Animals, 1999)¹.

OBJETIVO	ANTIMICROBIANOS
Tratamiento de varias infecciones	Eritromicina, fluoroquinolona, gentamicina, neomicina, penicilina, espectinomicina, tetraciclinas, tirosina, virginiamicina.
Crecimiento y eficacia alimentaria	Bambermicina, bacitracina, clortetraciclina, penicilina, tilosina, virginiamicina.

2.3 Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal:

2.3.1 Definición:

Son los compuestos que permanecen en el organismo animal como consecuencia de un tratamiento, incluyendo el principio activo original y/o los productos de biotransformación (metabolitos) ^{11,12}.

Todos los medicamentos veterinarios, ya sea utilizada con una finalidad terapéutica, profiláctica o de diagnóstico, pueden dejar residuos de sus sustancias madres o compuestos de origen y/o sus metabolitos en los alimentos, esto sucede si no se respetan los modos de empleo oficialmente autorizados, incluidos los períodos de suspensión de tratamiento. Ejemplos: antimicrobianos como las sulfas, los nitrofuranos; antiparasitarios; tranquilizantes; tratamientos hormonales y todo otro medicamento, que se utiliza en la clínica animal.

Los efectos de estos residuos pueden ser nulos, si sus cantidades son ínfimas y son consumidos ocasionalmente, hasta tener consecuencias graves, si se ingieren diariamente y se acumulan en nuestros tejidos ¹¹.

2.3.2. Efectos toxicológicos.

Los efectos de los residuos no se manifiestan con un problema de toxicidad aguda, nadie se enfermará por consumir “algunas veces” un alimento animal con residuos de medicamentos. La manifestación es a largo plazo, por la ingestión de pequeñas cantidades de residuos en forma continua y por períodos prolongados^{1, 11}.

Pueden englobarse en dos grandes grupos:

- a) **Efectos directos:** Son aquellos producidos por la utilización de antimicrobianos en condiciones terapéuticas. Se manifiestan dentro de amplias y variadas formas clínicas como toxicidad en riñón, hígado, sangre, médula, oído, efectos teratogénicos, carcinogénicos y alergias graves.
- b) **Efectos indirectos:** Están representados por las formas de alergia y los fenómenos de resistencia bacteriana².

- **Alergias:**

Los antimicrobianos son haptenos, es decir, necesitan estar acoplados a una proteína para comportarse como antígenos capaces de inducir la formación de anticuerpos específicos. La sensibilización no suele depender de la dosis administrada. Los antimicrobianos que se eliminan sin sufrir transformación (por ejemplo, eritromicina, tetraciclinas), aparentan tener escaso poder antigénico. En cambio, los que se desdoblan parcialmente (por ejemplo, penicilinas, estreptomicina, sulfamidas), desempeñan, a menudo, el papel de alergen.

Se entiende por efectos alérgicos: a la reacción clínica de un individuo sensibilizado a una sustancia inocua para algunos, pero que produce un efecto alérgico en su caso personal^{1,12}.

▪ Resistencia bacteriana:

Es la capacidad adquirida por un organismo para resistir los efectos de un antimicrobiano ante el cual es normalmente susceptible¹³.

En los microorganismos patógenos pueden producirse mutaciones para obtener la resistencia a los agentes quimioterapéuticos y, en presencia del medicamento, la forma mutante tiene una ventaja selectiva y puede sustituir al tipo original de microorganismo.

El uso incontrolado de los medicamentos está ocasionando un rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos en los microorganismos causantes de enfermedades.

La adición de bajas concentraciones de antimicrobianos a los piensos animales estimula el crecimiento del animal, acortando el periodo requerido para poder llevar al animal al mercado. El problema que plantean las bajas concentraciones de antimicrobianos en los piensos animales es que debido al continuo contacto, se selecciona una microbiota que es resistente a los antimicrobianos; por tanto su uso en la alimentación animal expande por la naturaleza el reservorio de genes de resistencia a los antibióticos. Debido a que parte de la biota del intestino de los animales también habita en el intestino humano, la transmisión de biota resistente desde los animales a las personas es una posibilidad real ya que los organismos resistentes pueden infectar a las personas a través de carne contaminada o mediante el contacto con animales vivos².

2.3.3 Aspectos toxicológicos:

Para la evaluación del riesgo de los residuos de medicamentos animales se toman en cuenta los siguientes parámetros^{1, 2, 13}

- Los estudios de toxicidad llevados a cabo en animales de laboratorio y especialmente por los estudios a largo plazo por ingestión regular del producto, definiéndose así el Nivel Sin Efectos Adversos Observables (NOEL), que es la dosis más alta que no produce efectos adversos observables en la especie más sensible estudiada.
- La Ingestión Diaria Admisible (IDA), que es la cantidad diaria de un determinado residuo que puede ingerir el hombre durante su vida sin riesgo para la salud. Se calcula dividiendo el NOEL por un Factor de Seguridad (FS), que se fija arbitrariamente, teniendo en cuenta el grado de certeza con los resultados toxicológicos pueden extrapolarse a los humanos.

Teniendo en cuenta los dos parámetros anteriormente mencionados se define un Límite Máximo de Residuos (LMR), que es la concentración máxima de un residuo aceptable en un alimento y se calcula tomando la IDA, multiplicándola por un peso persona promedio de 60 Kg. y dividiendo esa cifra por la ingesta media diaria del alimento considerado. Cuando se establece un LMR para una sustancia, se especifica en qué tejido deben cuantificarse los residuos y cuáles son los compuestos que deben analizarse. Se define como tejidos marcadores (músculo, hígado, riñón, grasa) a aquel para el cual se fija el LMR y que debe ser analizado a los fines de control de residuos. Frecuentemente es el tejido en donde los metabolitos permanecen un tiempo prolongado^{11, 12}.

Para garantizar que la concentración residual de los antibióticos no sea superior a su correspondiente LMR, se hace necesario establecer un tiempo de espera. Este tiempo de espera es el plazo de tiempo que debe transcurrir, y ser respetado, desde el último tratamiento farmacológico hasta el sacrificio de los animales para poder consumir la carne o recoger sus productos (leche, huevos) para su comercialización e ingestión^{11, 12}.

2.4 Características de los métodos de análisis de residuos de medicamentos veterinarios.

Según el *Codex Alimentarius*¹²: los métodos se pueden clasificar según la información y detalles analíticos facilitados con respecto a la cuantía y al carácter del analito o analitos de interés, son de tres tipos:

- **Tipo I:** Cuantifican el volumen de un analito específico o una clase de analitos e identifican positivamente el analito, por lo que ofrece el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito en el tipo de interés. Estos métodos pueden constituir un procedimiento único por el que se determinan tanto la concentración como la identidad del analito o ser una combinación de métodos para cuantificar y confirmar la estructura del residuo de un medicamento veterinario. Por ejemplo: Técnica Cromatográfica Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- **Tipo II:** Determinan la concentración del un analito en el tipo de interés, pero no permiten una identificación inequívoca de la estructura. Estos métodos pueden emplearse también para verificar la presencia de un compuesto o clase de compuestos. Dos métodos de éste tipo pueden facilitar información oportuna para un método del Tipo I cuando aplican procedimientos químicos diferentes.
- **Tipo III:** Proporcionan una información menos definitiva pero útil. Estos procedimientos de ensayo determinan por lo general la presencia o ausencia de un compuesto o clase de compuestos en un tipo de interés especificado. Con frecuencia se basan en técnicas no instrumentales. En esta categoría se incluyen muchos de los procedimientos microbiológicos de ensayo con placas de agar, ensayos de inhibición de enzimas y sistemas basados en la inmunología. Son útiles en los programas de control de residuos debido a su gran capacidad muestral, su comodidad y su posible adecuación en los distintos laboratorios. Por ejemplo: Método de las cuatro placas.

2.5. Métodos utilizados en el análisis:

2.5.1. Método microbiológico de difusión de las cuatro placas:

Este método fue desarrollado por el equipo de trabajo de la Comisión Científica de Veterinaria de la Comisión de las Comunidades Europeas (CCE) en colaboración con expertos de nueve estados miembros de la misma comunidad, aproximadamente en el año 1980. El resultado de este equipo de trabajo fue un método microbiológico estandarizado altamente sensible. El método propuesto es un test de difusión de agar de cuatro placas, en el cual se utilizan dos microorganismos diferentes (*Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* ATCC).

En realidad el test se basa en otros tests ya existentes, siendo el nuevo elemento la placa que contiene Trimetoprima y *Bacillus subtilis*, con el fin de detectar los residuos de sulfamidas. Básicamente, el test de residuos de antibióticos de la CCE es una combinación del Test alemán: «AH-Test», del test «*Sarcina lutea*» (modificado a pH 8) y una variante del test existente para sulfonamida¹².

En el test de «*Sarcina lutea*» por van Schothorst, M. en 1970; se dispensa una placa con *Sarcina lutea* ATCC 9341, ajustada a pH 6,0; luego se coloca un papel de filtro de diámetro de 1,2 cm sobre el riñón cortado por unos 30 a 60 minutos, se extrae el papel con una pinza y se coloca sobre la placa. Se incuba 18 a 20 h a 37°C y se lee el diámetro de inhibición. También este trabajo incluye una forma de identificación de antibióticos.

El test de sulfonamida de Gudding, R. en 1976; método bacteriológico para la detección de residuos de sulfonamidas en alimentos; se basaba en la adición de trimetoprima al medio Mueller-Hinton. La cantidad de trimetoprima adicionada va a depender de la bacteria utilizada *Micrococcus luteus*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus megaterium*. Este trabajo tuvo la finalidad de comprobar que los efectos de sinergia de las sulfonamidas y la trimetoprima aumenta la sensibilidad del test¹².

El método de las cuatro placas se basa en el cultivo de un microorganismo en agar que tiene sensibilidad frente a un antimicrobiano o grupos antimicrobianos determinados que se encuentran como residuos en los tejidos de origen animal o en sus productos^{3, 12}.

Esta técnica puede ser modificada, para conseguir un amplio espectro de identificación, aumentando una placa con otro grupo de antimicrobianos para ello se juega con la siembra en agares de distinta composición y pH por ejemplo para quinolonas adicionando *E.coli* como bacteria a ser inhibida y el medio nutritivo a pH 7.2⁷.

2.5.2. Método Cuantitativo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)⁷:

La cromatografía líquida de alta resolución ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década del 70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno¹⁵.

La cromatografía se define según la IUPAC como “un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa.”

El resultado obtenido de la cromatografía es un cromatograma el cual según IUPAC es “un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo”¹⁵.

Esta técnica se considera muy importante a nivel de análisis químico ya que no solo permite la separación de los componentes de la mezcla sino

también la identificación y la cuantificación de estos. Además es elegida entre otras técnicas de separación por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles y su aplicación a sustancias de primordial interés en la industria.

▪ **APTITUD DEL SISTEMA⁷:**

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y de gases. Se emplean para verificar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico sean adecuadas para el análisis a realizar.

Las pruebas se basan en que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal.

La resolución es una función de la eficiencia de la columna y se especifica para asegurar que los compuestos que eluyen muy cerca entre si se resuelvan unos de otros, para establecer el poder de resolución del sistema y para asegurar que el estándar interno se resuelva del fármaco.

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar empleada en la valoración y otra solución estándar se comparan para determinar si cumplen con los requisitos de precisión. A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del analito para calcular la desviación estándar relativa, si el requisito es 2,0% o menos ; se emplean los datos de seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar es mas de 2,0%.

Si es necesario realizar ajustes en las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema, se pueden considerar cada una de las siguientes variaciones máximas. Se permiten ajustes solo cuando se encuentran disponibles estándares adecuados de todos los componentes usados en la prueba de aptitud y solo cuando aquellos estándares sean los usados para demostrar

que los ajustes han mejorado la calidad de la cromatografía en cuanto al cumplimiento de los requisitos de aptitud del sistema con el fin de cumplir con los requisitos del cromatograma.

El usuario debe verificar la aptitud del método bajo las nuevas condiciones mediante la evaluación de las características analíticas de desempeño pertinente que sean potencialmente afectadas por el cambio.

pH de la Fase Móvil.- El pH de la solución amortiguadora acuosa usada en la preparación de la fase móvil puede ajustarse dentro de las ± 0.2 unidades del valor o intervalos especificados.

Longitud de onda del detector UV-Visible.- No están permitidas las desviaciones de las longitudes de onda especificadas en el método. Se debe usar el procedimiento especificado por el fabricante del detector u otro procedimiento validado, para verificar que el error en la longitud de onda del detector no sea mayor del $\pm 3\text{nm}$.

Longitud de columna: Puede ajustarse hasta $\pm 25\%$.

Diámetro interno de columna: Puede ajustarse hasta $\pm 25\%$.

Tamaño de partícula (HPLC): Puede reducirse hasta un 50%.

Velocidad de Flujo (HPLC): Puede ajustarse hasta $\pm 50\%$.

Volumen de inyección (HPLC): Puede reducirse hasta tanto lo permitan los límites de detección y precisión aceptados.

III. PARTE EXPERIMENTAL:

3.1. MUESTREO Y MUESTRA :

El diseño del muestreo se basó en datos tomados de la Asociación Peruana de Avicultura, el cual considera un aumento significativo del consumo de pollo en la ciudad de Lima per cápita de 58 kilos. Por esta razón se estimó conveniente realizar un muestreo no probabilístico de la población, tomando para ello cinco muestras de cada mercado obteniendo un total de veinte muestras.

La unidad de análisis estuvo conformada por una porción del músculo pectoral torácico (pechuga). Las muestras se empacaron en bolsas de polietileno de primer uso debidamente rotuladas para luego ser congeladas a $-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2 MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE DETECCIÓN: DIFUSIÓN EN PLACA

Técnica de difusión de las cuatro placas.

3.2.1 PRINCIPIO DEL ENSAYO:

Este método es aplicable a músculos esqueléticos de animales de carnicería y tiene el objetivo de evidenciar la presencia de residuos de antimicrobianos pero no permite determinar la identidad del residuo inhibidor. La técnica se basa en la difusión de los residuos antimicrobianos presentes en una muestra de tejido animal que se pone en contacto con un medio de cultivo inoculado con un microorganismo inhibiendo su crecimiento y dando lugar a la formación de zonas de inhibición.

3.2.2 DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO:

Se coloca en una placa petri un medio nutritivo sólido con un microorganismo sensible a los antimicrobianos, sobre este medio se coloca un trozo de muestra y la placa se incuba a la temperatura de desarrollo óptima del microorganismo. Si la muestra contiene residuos de antimicrobianos en cantidades detectables, éstos inhiben el

desarrollo de los microorganismos con lo cual se observa una zona de inhibición alrededor de la muestra. Como control, en cada placa se coloca un disco con un determinado inhibidor en una cantidad predeterminada, dependiendo de la placa; estos discos deben producir alrededor de los mismos una zona de inhibición del microorganismo. Se utilizan 4 placas con dos especies de microorganismos (*B.subtilis* se siembra en tres placas a pH diferentes, *M.luteus*), y medios de cultivo a pH distintos como se indica en el cuadro N° 3, también se observa el grupo de inhibidores que detecta particularmente cada placa.

CUADRO N° 3: Grupo de inhibidores que detecta el método con sus respectivos microorganismos a pH determinado.

Grupo de Inhibidores	Microorganismos	pH del medio (a 37° C)
Penicilinas y tetraciclinas	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	6,0
Sulfonamidas	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	7.2
Aminoglucósidos	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	8,0
Macrólidos	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	8,0

3.2.3. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:

A. CONSIDERACIONES GENERALES:

Las muestras de tejido muscular de pollo deben tener un bajo contenido microbiano para minimizar la interferencia en el ensayo por la microflora contaminante.

Idealmente las muestras deberían ser evaluadas después de colectadas.

B. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES:

- Estufa de incubación a 37 ± 1 °C.
- Congelador con temperatura igual o menor a -18 °C ± 1 °C.
- Agitador tipo vortex.
- Balanza analítica Sartorius al 0,1mg.
- Balanza Digital Mettler Toledo a 10 mg.
- Desecador para estándares.
- Bisturí.
- Sacabocado 8 mm de diámetro y 2 cm de largo.
- Asa de Kolle de acero inoxidable.
- Pinzas de acero.
- Bandeja de acero inoxidable.
- Placas de Petri de 10 cm de diámetro.
- Matraces de 125 y 250 mL.
- Fiolas de 25, 50, 100, 200 y 1000 mL.
- Frasco Roux de 250 mL.
- Tubos de ensayo de 16 x 160 mm.
- Pipetas de 1, 2 y 10 mL.
- *Bacillus subtilis* BGA. ATCC 6633.
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341.
- Potenciómetro calibrado Orión.
- Tiras reactivas Merck.
- Vernier Professional.
- Autoclave Calibrado.

C. PREPARACIÓN DE MEDIOS Y SOLUCIONES PATRÓN:

MEDIOS DE CULTIVO:

▪ AGAR TRIPTICASA SOJA (TSA), MERCK:

Se pesó 40g (al decigramo más próximo) y se disolvió en el agua. Se llevó a volumen de 1000 mL. Se transfirió la solución a un matraz, se calentó hasta ebullición. Se verificó el pH a 45 °C con tiras reactivas y se corrigió con HCl 1N o NaOH 1N en los casos necesarios. El pH a 25 °C obtenido fue de $7,3 \pm 0,2$ medido con potenciómetro para su exactitud. Se dispensó en tubos de 10 mL y se esterilizó a 121 ± 1 °C durante 15 minutos. Los tubos luego se inclinaron para obtener un pico de flauta de unos 10 cm.

La preparación del medio TSA se realizó de acuerdo a las indicaciones del producto, con el fin de mantener las cepas en condiciones óptimas a utilizar en el análisis.

▪ AGAR ANTIBIÓTICO N° 11, DIFCO BD:

Se pesó 30,5 g (al decigramo/centigramo más próximo) y se disolvió en el agua destilada. Se llevó a volumen de 1000 mL. Se transfirió la solución a un matraz y se calentó hasta ebullición. Se separó en cuatro partes iguales y se corrigió con HCl 1N o NaOH 1N hasta obtener en las dos primeras pH de 8 la cuarta a pH de 6 $\pm 0,1$ y la última a pH 7.2 medidos con potenciómetro para su exactitud. Se esterilizó a 121 ± 1 °C durante 15 minutos. Se refrigeró hasta el momento de utilizarlas.

SOLUCIONES A UTILIZAR:

▪ SOLUCIÓN FISIOLÓGICA:

Se pesó 5,0 $\pm 0,1$ g de cloruro de sodio y se disolvió en agua destilada. Se llevó a volumen de 1000 mL. Se dispensó en

porciones convenientes y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 ± 1 °C.

▪ **SOLUCIÓN PATRÓN DE PENICILINA:**

Se pesó aproximadamente 30,0mg \pm 0,1mg de penicilina G sódica con una potencia de 1678,02 UI/mg en una fiola de 50 mL. Se llevó a 50 mL con agua destilada (solución madre). En el momento de empleo se preparó una dilución 1/1000 v/v de la solución madre realizando dos diluciones sucesivas, 1/50 v/v y 1/25 v/v (soluciones hijas). Las soluciones obtenidas contenían concentraciones de 0,02 y 0.0008 UI de penicilina por mL. La solución madre de penicilina se conservó en refrigeración (entre 2 a 8 °C) un máximo de 2 días.

▪ **SOLUCIÓN PATRÓN DE ESTREPTOMICINA:**

Se pesó aproximadamente 30,0mg \pm 0,1mg de estreptomicina con potencia de 618,15 UI/mg. Se disolvió con agua destilada y se llevó a volumen en una fiola de 100 mL (solución madre). En el momento de empleo se preparó una dilución 1/25 v/v de la solución madre. La solución obtenida contenía una concentración aproximada de 10 UI de estreptomicina por mL. La solución madre de estreptomicina se conservó en refrigeración (entre 2 a 8 °C) un máximo de 2 semanas.

▪ **SOLUCIÓN PATRÓN DE ERITROMICINA:**

Se pesó aproximadamente 54,0 \pm 0,1 mg con potencia de 1004,44UI/mg, se disolvió con 1 mL de metanol. Se llevó a volumen con el agua destilada en una fiola de 50 mL (solución madre). En el momento de empleo se diluyó la solución madre mediante dos diluciones sucesivas, 1/25 v/v y 1/50 v/v (soluciones hijas). La solución obtenida contenía una concentración 0,8 UI de eritromicina por mL. La solución madre

de eritromicina se conservó en refrigeración (entre 2 a 8 °C) un máximo de 2 semanas.

▪ **SOLUCIÓN PATRÓN DE SULFAMETOXAZOL:**

Se pesó 50,0 mg de sulfametoxazol con potencia 99,85% en un matraz de 50 mL, se disolvió con 2 mL de NaOH 0,2 N. Se llevó a 50 mL con agua destilada (solución madre). En el momento de empleo se preparó una dilución 1/20 v/v (solución hija). La solución obtenida contenía una concentración de 0,05 mg de sulfametoxazol por mL. La solución madre de sulfametoxazol se conservó en refrigeración (entre 2 a 8 °C) un máximo de 2 semanas.

▪ **SOLUCIÓN DE TRIMETOPRIMA:**

Se pesó 50,0mg +/- 0,1 de un estándar de trimetoprima con potencia de 98,5% p/p, se disolvió con la ayuda del ácido acético y se completó el volumen con el agua destilada en un matraz aforado de 500 mL (solución madre). En el momento de utilización se realizó una dilución 1/20 v/v (solución hija). Se esterilizó por filtración. La solución madre de trimetoprima se conservó en refrigeración (entre 2 a 8 °C) un máximo de dos semanas.

D. ENSAYOS PREVIOS AL ANÁLISIS:

ENSAYO CON ESTÁNDARES

Estos ensayos se realizaron con el propósito de comprobar eficacia de los estándares, fortificando en primer lugar las muestras con las diluciones respectivas para luego medir las zonas inhibidas con el fin de elegir la dilución adecuada a utilizar y compararla con las muestras.

- **Fortificación de muestras:**

Se extrajo la muestra con ayuda de sacabocado 8mm de diámetro y 2cm de largo, cortaron 8 discos de 2mm de espesor y luego se fortificaron con las soluciones patrones y sus respectivas diluciones de concentraciones conocidas (penicilina, estreptomicina, sulfametoxazol y eritromicina), se utilizó para ello una jeringa con 10uL para añadir la solución patrón correspondiente a cada muestra con el objetivo de tener una referencia del halo de inhibición.

PREPARACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS:

Estos ensayos se realizaron con el propósito de identificar la dilución más apropiada de cada microorganismo para el análisis, para ello se observó y comparó placas con crecimiento bacteriano para seleccionar las placas con el crecimiento óptimo a trabajar.

- **Cultivos de reserva:**

Se realizó una siembra por estría en un tubo con agar TSA. Se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Estos cultivos se almacenaron en refrigeración (entre 2 a 8 °C) y fueron repicados una vez al mes.

- a. Bacillus subtilis:*

El microorganismo *Bacillus subtilis*, se utilizó a partir de la dilución de un tercer pasaje. Se preparó diluciones decimales para hallar la dilución óptima.

Recuento de la suspensión del microorganismo: Se realizó el recuento de cada dilución con el fin de determinar la concentración del microorganismo por placa como sigue:

- Se prepararon diluciones sucesivas (hasta 10^{-10}) en tubos con 9 mL de solución fisiológica.
- Se sembró 1 mL de las diluciones en placas con el agregado de agar TSA.
- Luego de incubar las placas a 37 °C durante 24 horas, se realizaron los recuentos y se calculó la cantidad de colonias por mL, hallando de esta forma la dilución a utilizar.
- Se utilizó la dilución 10^{-1} de la muestra madre.

Preparación de las placas:

Se preparó placas de agar antibiótico 11 a pH 6 y 8 (37 °C).

- Cada 11 mL de medio previamente temperado a unos 45°C se inoculó con 2 mL de la suspensión bacteriana con el fin obtener un crecimiento denso y uniforme de 104 microorganismos por mL aproximadamente.
- Cada medio se distribuyó en placas de Petri a razón de 11mL por placa de manera de obtener un espesor de agar de 2 mm. Las placas debieron permanecer en una superficie horizontal hasta que el agar se solidificó.
- Si las placas no se utilizaron en el mismo día, se conservaron en refrigeración (entre 2 a 8 °C) hasta una semana.
- Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

b. Micrococcus luteus:

El microorganismo utilizado es *Micrococcus luteus* ATCC 9341, se utilizó a partir de la dilución de un tercer pasaje.

Preparación de la suspensión de microorganismos:

Se realizaron 2 repiques sucesivos de *M. luteus* a partir de un cultivo de reserva.

- Los tubos con TSA se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 horas.
- Se cosechó el cultivo del último repique con la ayuda de 2 mL de solución fisiológica.
- El cultivo en forma de suspensión se distribuyó sobre la superficie de agar TSA (200 mL) contenido en un frasco de Roux.
- El cultivo se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 horas.
- El cultivo se cosechó con la ayuda de 10 mL de solución fisiológica. Se llevó a 50 mL con solución fisiológica.
- Esta suspensión se conservó en refrigeración (entre 2 a 8 °C) hasta 1 mes.
- Se sembró 1 mL de la suspensión en placas con el agregado de agar TSA.
- Se incubaron las placas a 37 ± 1 °C durante 24 horas, luego se realizaron las lecturas para conocer la cantidad de colonias a utilizar.

Preparación de las placas:

- Se preparó placas de agar antibiótico 11 a pH 8 (37 °C).
- Cada 11 mL de medio previamente temperado a unos 45 °C se inoculó con 2mL de la suspensión bacteriana con el fin obtener un crecimiento denso y uniforme de 110 microorganismos por mL aproximadamente.
- Cada medio se distribuyó en placas de Petri a razón de 11mL por placa de manera de obtener un espesor de agar de 2 mm. Las placas debieron permanecer en una superficie horizontal hasta que el agar se solidificó.

- Si las placas no se utilizaron en el mismo día, se conservaron en refrigeración (entre 2 a 8 °C) hasta una semana.
- Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

E. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO:

Se extrajeron las muestras del congelador unos minutos antes de realizar el ensayo. Éstas se colocaron sobre una bandeja de acero inoxidable y con la ayuda de un sacabocados se extrajo un trozo de muestra de 8 mm de diámetro por 2 cm de largo, con un bisturí se cortó este trozo en 8 discos de 2 mm de espesor, para luego colocarlos en las placas respectivas.

F. DETECCIÓN DE RESIDUOS:

BETALACTÁMICOS (PENICILINA):

Preparación de las placas:

- El medio antibiótico 11 a pH 6 previamente se temperó a unos 45 °C y por incorporación se agregó a las placas que contiene 2 mL de suspensión de *B. subtilis*.
- El medio se distribuyó en placas de Petri a razón de 11 mL por placa de manera de obtener un espesor del agar de 2 mm.
- Las placas debieron permanecer en una superficie horizontal para permitir que el agar solidifique.

Técnica de Difusión:

En cada una de las 4 placas se colocaron de 3 a 6 discos de cada muestra ensayo a una distancia de 1 cm del borde de la placa. En cada una de las placas se colocó un disco control con la sustancia inhibidora penicilina de concentración 0,01UI. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

AMINOGLUCÓSIDOS (ESTREPTOMICINA):

Preparación de las placas:

- El medio antibiótico 11 a pH 8 previamente se temperó a unos 45 °C y por incorporación se agregó a las placas que contiene 2 mL de suspensión de *B. subtilis*.
- El medio se distribuyó en placas de Petri a razón de 11 mL por placa de manera de obtener un espesor del agar de 2 mm.
- Las placas debieron permanecer en una superficie horizontal para permitir que el agar solidifique.

Técnica de Difusión:

En cada una de las 4 placas se colocaron de 3 a 6 discos de cada muestra ensayo a una distancia de 1 cm del borde de la placa. En cada una de las placas se colocó un disco control con la sustancia inhibidora estreptomicina de concentración 0,1UI. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

SULFAMIDAS (SULFAMETOXAZOL):

Preparación de las placas:

- El medio antibiótico 11 a pH 7.2 previamente se temperó a unos 45 °C y por incorporación se agregó a las placas que contiene 2 mL de suspensión de *B. subtilis*.
- Luego se agregó la solución de trimetoprima estéril de manera de obtener una concentración final de 1% (v/v).
- El medio se distribuyó en placas de Petri a razón de 11 mL por placa de manera de obtener un espesor del agar de 2 mm. Las placas debieron permanecer en una superficie horizontal para permitir que el agar solidifique.

Técnica de Difusión:

En cada una de las 4 placas se colocaron de 3 a 6 discos de cada muestra ensayo a una distancia de 1 cm del borde de la placa. En cada una de las placas se colocó un disco control con la sustancia inhibidora sulfametoxazol de concentración 0,5 µg. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

MACRÓLIDOS (ERITROMICINA):

Preparación de las placas:

- El medio antibiótico 11 a pH 8 previamente se temperó a unos 45 °C y por incorporación se agregó a las placas que contiene 2 mL de suspensión de *M. luteus*.
- El medio se distribuyó en placas de Petri a razón de 11 mL por placa de manera de obtener un espesor del agar de 2 mm. Las placas debieron permanecer en una superficie horizontal para permitir que el agar solidifique.

Técnica de Difusión:

En cada una de las 4 placas se colocaron de 3 a 6 discos de cada muestra ensayo a una distancia de 1 cm del borde de la placa. En cada una de las placas se colocó un disco control con la sustancia inhibidora eritromicina de concentración 0,008 UI. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

CUADRO N° 4: Concentraciones de los grupos de inhibidores de acuerdo al microorganismo, pH por placa, temperatura y tiempo de incubación.

Microorganismo	pH del Medio a 37 °C	Disco Control (Sustancia: volumen que se coloca sobre el disco por la concentración de la solución = cantidad final en el disco)	T° de incubación (+/-1 °C)	Tiempo de incubación
<i>B. subtilis</i>	6	Penicilina: 10 uL x 1UI/mL = 0,01UI	37 °C	24 horas
<i>B. subtilis</i>	8	Estreptomicina: 10 uL x 10UI/mL = 0,1UI	37 °C	24 horas
<i>B. subtilis</i>	7,2	Sulfametoxazol: 10 µL x 0,05mg/mL = 0,5 µg	37 °C	24 horas
<i>M. luteus</i>	8	Eritromicina: 10 uL x 0,8UI/mL = 0,008 UI	37 °C	24 horas

3.3 CONSIDERACIONES PARA LA LECTURA DE LOS DISCOS:

En cada una de las placas se verificó si existe una zona de inhibición alrededor de las muestras, para lo cual se consideró lo siguiente:

- Las zonas de inhibición son medidas por un vernier, considerando el diámetro en mm.
- La medición se hace desde el borde de los discos de tejido hasta el borde de la zona de inhibición.
- **Resultado Positivo:** Si la zona de inhibición es mayor o igual a 2 mm (0,2cm) medidos desde el borde de la muestra hasta el borde de la zona de inhibición.
- **Resultado Ambiguo:** Si por ejemplo se observan colonias esparcidas en la zona de inhibición, el ensayo se repite.
- **Resultado Negativo:** Si al repetirse el ensayo vuelve a obtenerse resultado ambiguo y si la zona de inhibición es menor a 2 mm o no existe zona de inhibición.

3.4 MÉTODO INSTRUMENTAL DE CUANTIFICACIÓN:

3.4.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

La muestra que contiene el analito de interés a ser cuantificado es tratada previamente con el fin de extraer dicho analito para luego cuantificarlo a través de la cromatografía líquida. La muestra tratada pasa a través de una columna específica, la cual previamente a sido sometida a saturación con fase móvil, aquí tiene lugar la separación de los componentes presentes en la muestra, el analito de interés se detecta de acuerdo a la mayor absorbancia la cual es representada gráficamente mediante un pico con características aceptables de acuerdo a parámetros analíticos como asimetría, platos teóricos, tiempo de retención, factor de capacidad, resolución, entre los más importantes.

3.4.2. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución – HPLC.
- Columna cromatográfica tipo L1 (C18)125mm x 4.5mm x 5um.
- Agitador tipo vortex.
- Balanza Digital Mettler Toledo a 0.1 mg.
- Potenciómetro calibrado ORION.
- Desecador para estándares.
- Sonicador BRANSON 3510.
- Bisturí.
- Mortero con pilón.
- Tubos de ensayo.
- Beakers de 50 ml.
- Baño María.
- Centrifuga
- Pinzas.
- Bandeja de acero inoxidable.
- Filtros PVDF.
- Filtros 0.45um.

3.4.3. ANTIMICROBIANOS POR CUANTIFICAR:

A. SULFAMETOXAZOL POR HPLC⁷:

- **Conservación de la muestra:** Las muestras utilizadas se conservaron sin triturar y en congelación hasta la realización del análisis. Después de descongelar se trituró pasando al proceso de extracción.
- **Reactivos:**
 - Metanol HPLC.
 - TEA (triethylamina).
 - Ácido fosfórico p.a.
 - Agua destilada HPLC.

- **Preparación de la Fase Móvil:**

Medir 780 mL de agua en una probeta y verter a un Beaker de litro, en otra probeta medir 220mL de Metanol HPLC mezclar con el agua agregar 1 ml de TEA (trietilamina) mezclar y llevar a pH 5.5 con la ayuda de un potenciómetro y ácido fosfórico p.a. Luego filtrar la mezcla por poro 0.45um.

- **Preparación del Estándar:**

Pesar 20 mg de estándar de sulfametoxazol en una fiola de 100mL agregar 20ml de metanol HPLC, disolver y enrasar con metanol. Tomar 1 ml de la dilución anterior en una fiola de 100ml y enrasar con fase móvil.

- **Preparación de muestra:**

Triturar la muestra con un bisturí luego en un mortero con pilón hasta que se vuelva una masa pastosa homogénea pesar exactamente 500mg en un balanza y llevarlo a un tubo de ensayo agregar 5 ml de metanol agitar con el agitador tipo vortex por 5 minutos aproximadamente luego centrifugar la muestra por 15 min a 6000rpm y verter el sobrenadante en un Beaker de 50ml en un baño maría, llevar a sequedad y luego agregar 1ml de fase móvil y filtrar por 0.45 um a viales para inyección en el HPLC.

- **Condiciones cromatográficas:**

Equipo: HPLC Agilent 1200

Columna: Columna L1 (C18)125mm x 4.5mm x 5um

Longitud de onda: 254 nm

Temperatura: 30°C

Flujo: 1,5 mL/min

Volumen de inyección: 20uL

Tiempo de corte: 10min

Tiempo de acondicionado: 30 min

B. AMPICILINA POR HPLC⁷:

- **Conservación de la muestra:** Las muestras utilizadas se conservaron sin triturar y en congelación hasta la realización del análisis.

- **Reactivos:**

- Fosfato monobásico de potasio 1M.
- Ácido acético 1N.
- Acetonitrilo HPLC.
- Agua destilada HPLC

- **Preparación del Diluyente:**

En un balón de 1 litro agregar 10mL de fosfato monobásico de potasio 1M y 1mL de ácido acético 1N diluir con agua destilada HPLC csp para 1 litro.

- **Preparación de la Fase Móvil:**

Medir 909 mL de agua en una probeta y verter a un balón de litro, en otra probeta medir 80mL de acetonitrilo HPLC mezclar con el agua agregar 10 ml de fosfato monobásico de potasio, mezclar y adicionar finalmente 1mL de ácido acético 1N. Mezclar bien y filtrar la mezcla al vacío por poro 0.45um.

▪ **Preparación del Estándar:**

Disolver 25mg de ampicilina estándar en fiola de 25mL con diluyente para obtener una concentración de 1mg/mL, agitar en ultrasonido, enrasar, filtrar por poro 0.45um. Usar inmediatamente después de su preparación.

▪ **Preparación de muestra:**

Triturar la muestra con bisturí luego en mortero con pilón hasta que se vuelva una masa pastosa homogénea luego pesar una cantidad que equivalga a 100mg/100mL en balanza analítica, agregar diluyente, agitar en ultrasonido por 30 minutos de manera que la ampicilina que se encuentra en la muestra se disuelva en el diluyente luego centrifugar la muestra por 15 min a 6000rpm. Filtrar el sobrenadante por poro 0.45um a viales para inyección en el HPLC.

▪ **Condiciones cromatográficas:**

Equipo:	HPLC Agilent 1200
Columna:	Columna L1 (C18)125mm x 4.5mm x 5um
Longitud de onda:	254 nm
Temperatura:	30°C
Flujo:	2 mL/min
Volumen de inyección:	70uL
Tiempo de corte:	8min
Tiempo de acondicionado:	30 min

C. NORFLOXACINO POR HPLC⁷:

- **Conservación de la muestra:** Las muestras utilizadas se conservaron sin triturar y en congelación hasta la realización del análisis.

- **Reactivos:**

- Ácido fosfórico 1 en 1000.
- Fosfato monobásico sodio 0.01M.
- Acetonitrilo HPLC
- Agua destilada HPLC.

- **Preparación de la solución de preacondicionado:**

Pesar 1.38g de fosfato monobásico de sodio y disolver con agua destilada HPLC csp 1 litro para obtener una solución 0.01M ajustar en potenciómetro a pH 4 con ácido fosfórico. La columna se acondicionó a flujo de 0.5mL/min por 4 horas.

- **Preparación de la Fase Móvil:**

Medir 1 mL de ácido fosfórico, verter en un balón de litro y agregarle agua csp, en otra probeta medir 150mL de acetonitrilo HPLC mezclar en balón de 1 litro con 850mL de ácido fosfórico 1 en 1000. Mezclar bien y filtrar la mezcla al vacío por poro 0.45um.

- **Preparación del Estándar:**

Pesar 20mg de norfloxacino estándar en fiola de 100mL y disolver en fase móvil para obtener una concentración de 0.2mg/mL, agitar en ultrasonido, enrasar con fase móvil, filtrar por poro 0.45um. Usar inmediatamente después de su preparación.

- **Preparación de muestra:**

Triturar la muestra con bisturí luego en mortero con pilón hasta que se vuelva una masa pastosa homogénea luego pesar una cantidad entre 4-5g de músculo esquelético de pollo en balanza analítica, verter en tubo de centrifuga agregando 5mL de la solución de fase móvil, llevar al ultrasonido por 30 minutos de manera que el norfloxacino que se encuentra en la muestra se disuelva en el diluyente. Luego centrifugar la muestra por 15 min a 6000rpm, filtrar la solución sobrenadante por filtro de poro 0.45um a viales para inyección en el HPLC.

- **Condiciones cromatográficas:**

Equipo:	HPLC Agilent 1200
Columna:	Columna L1 (C18)125mm x 4.5mm x 5um
Longitud de onda:	275 nm
Temperatura:	40°C
Flujo:	2 mL/min
Volumen de inyección:	10uL
Tiempo de corte:	8min
Tiempo de acondicionado:	30 min

D. CIPROFLOXACINO POR HPLC⁷:

- **Conservación de la muestra:** Las muestras utilizadas se conservaron sin triturar y en congelación hasta la realización del análisis.

▪ **Reactivos:**

- Ácido fosfórico 0.025M A pH 3.
- Ácido fosfórico 0.025M A pH 2.
- Trietilamina (TEA).
- Acetonitrilo HPLC
- Agua destilada HPLC.

▪ **Preparación de la solución diluyente:**

Medir 0.5mL de ácido fosfórico y disolver con agua destilada HPLC csp 1 litro para obtener una solución 0.025M ajustar en potenciómetro a pH 2 con TEA y acetonitrilo. La columna se acondicionó a flujo de 0.5mL/min por 4 horas.

▪ **Preparación de la Fase Móvil:**

Medir 87 mL de ácido fosfórico 0.025M ajustado a pH 3, verter en un balón de litro y agregarle acetonitrilo csp. Mezclar bien y filtrar la mezcla al vacío por poro 0.45um.

▪ **Preparación del Estándar:**

Pesar 20mg de norfloxacino estándar en fiola de 100mL y disolver en fase móvil para obtener una concentración de 0.2mg/mL, agitar en ultrasonido, enrasar con fase móvil, filtrar por poro 0.45um. Usar inmediatamente después de su preparación.

▪ **Preparación de muestra:**

Triturar la muestra con bisturí luego en mortero con pilón hasta que se vuelva una masa pastosa homogénea luego pesar una cantidad entre 4-5g de músculo esquelético de pollo en balanza analítica, verter en tubo de centrifuga agregando 5mL de la solución de fase móvil, llevar al ultrasonido por 30 minutos de

manera que el ciprofloxacino que se encuentra en la muestra se disuelva en el diluyente. Luego centrifugar la muestra por 15 min a 6000rpm, filtrar la solución sobrenadante por filtro de poro 0.45um a viales para inyección en el HPLC.

▪ **Condiciones cromatográficas:**

Equipo:	HPLC Agilent 1200
Columna:	Columna L1 (C18)125mm x 4.5mm x 5um
Longitud de onda:	275 nm
Temperatura:	40°C
Flujo:	2 mL/min
Volumen de inyección:	10uL
Tiempo de corte:	8min
Tiempo de acondicionado	: 30 min

3.5 RESULTADOS:

Al observar los resultados se tuvo en cuenta el diseño comparativo transeccional univariable no experimental, el cual nos permitió comparar un evento en un momento único del presente observando los sucesos en sus ambientes naturales. Se comparó entre sí los residuos de antimicrobianos con los límites máximos permitidos por la Unión Europea.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO:

A. LECTURA DE LOS DISCOS CONTROL (ESTÁNDARES):

Luego de la incubación los discos presentaron una zona de inhibición (desde el borde del disco hasta el borde de la zona de inhibición) de al menos 3mm (0.3cm.), la zona de inhibición se comparó con las muestras ensayo al mismo tiempo se verificó la eficacia de los estándares.

CUADRO N° 5: Zonas de inhibición de los estándares (mm) a diferentes concentraciones.

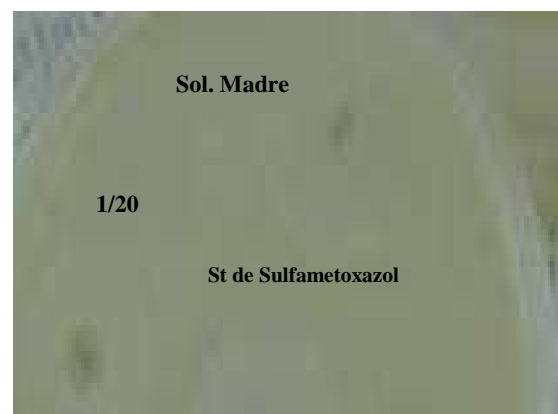
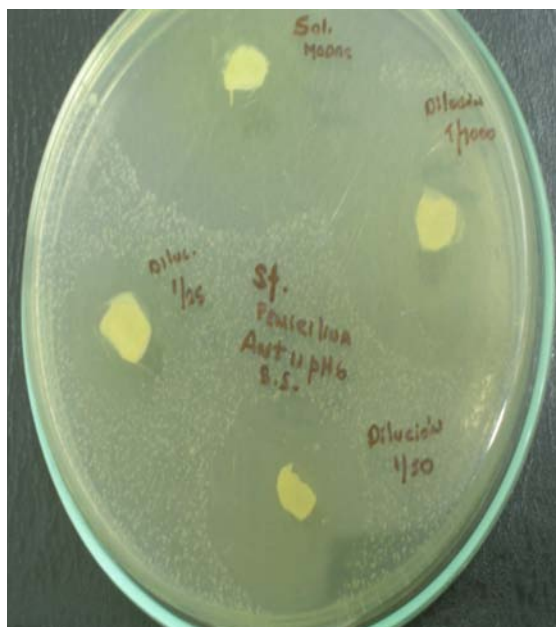
PENICILINA			
S.M (1000UI/mL)	1/1000 (1UI/mL)	1/50 (0,02UI/mL)	1/25 (0,0008UI/mL)
20 mm	15 mm	10 mm	6 mm
ESTREPTOMICINA			
S.M (250UI/mL)		1/25 (10UI/mL)	
14 mm		6 mm	
SULFAMETOXAZOL			
S.M (1mg/mL)		1/20 (0.05mg/mL)	
10 mm		4 mm	
ERITROMICINA			
S.M (1000UI/mL)	1/25 (40UI/mL)		1/50 (0,8UI/mL)
13 mm	8 mm		3 mm

S.M = Solución Madre

A/B= Diluciones

Se considera positivo > ó = 2mm.

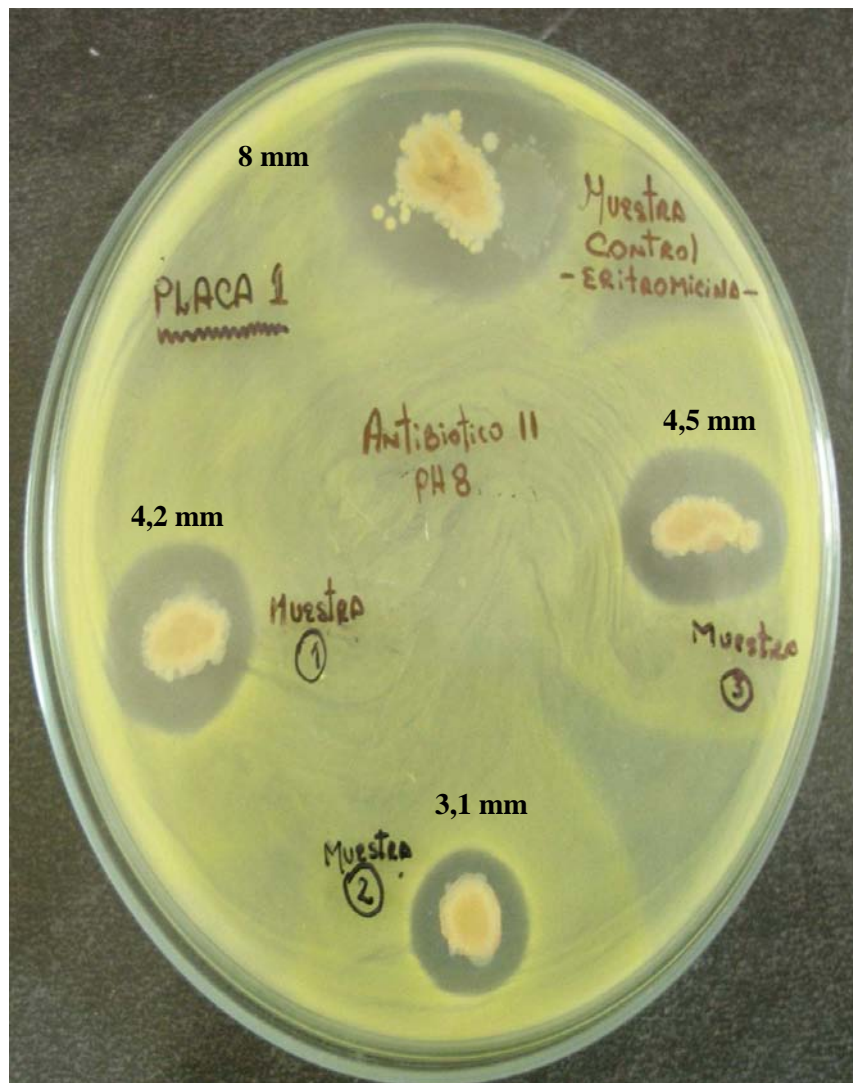
Figura 1: Zonas de inhibición de los Estándares a diferentes concentraciones.



B. LECTURA DE LOS DISCOS DE MUESTRAS ENSAYADAS:

Para la presencia de residuos antimicrobianos se consideró una muestra positiva si se obtuvo un resultado positivo en alguna de las cuatro placas.

Figura 2: Zonas de inhibición de las muestras ensayo positivas comparadas con la muestra control (eritromicina), placa pH 8 que corresponde a muestras tomadas del mercado Aurora (centro de Lima).



CUADRO N° 6: Promedio de zonas de inhibición (mm) por grupo de inhibidores y zonas de muestreo.

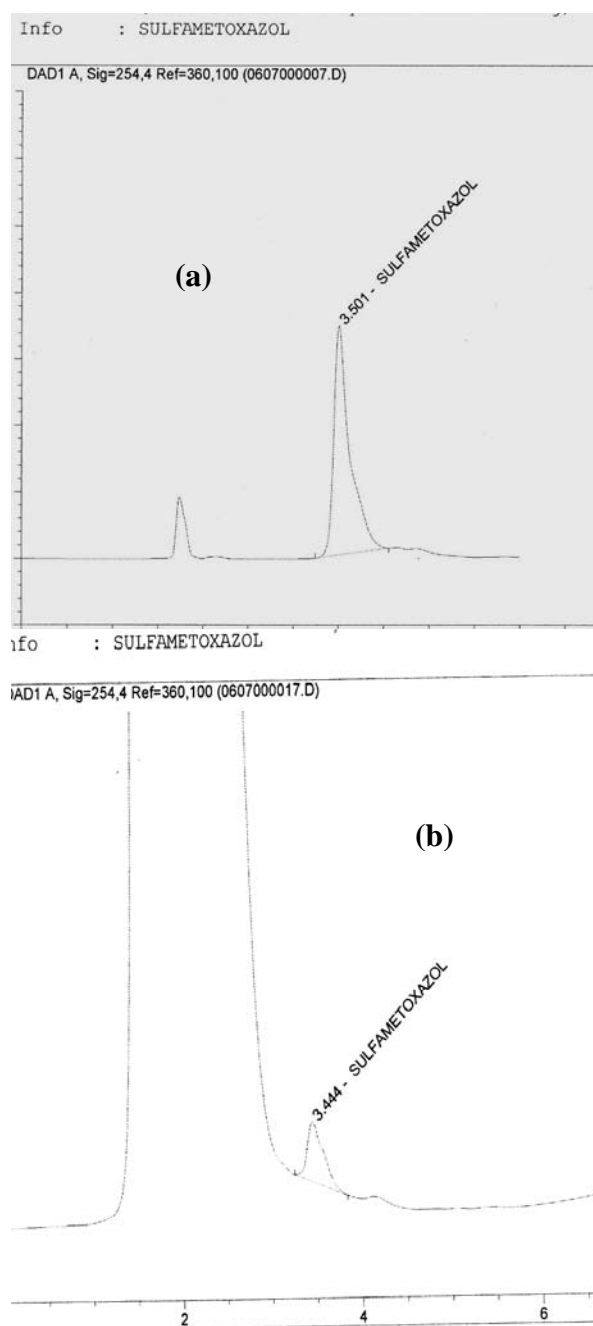
Grupos de Inhibidores	Zonas de Muestreo			
	Mercado Aurora	Mercado Central	Mercado Eco	Supermercado Metro
Penicilinas	0.5 mm	0.54 mm	1.02 mm	1.58 mm
Aminoglucósidos	0 mm	1.1 mm	1 mm	0 mm
Macrólidos	3.62 mm	2.72 mm	1.7 mm	0 mm
Sulfamidas	2.88 mm	2.0 mm	0.88 mm	1.08 mm

Al observar los resultados por grupos de inhibidores se determina que existen residuos de macrólidos y sulfamidas en las muestras de mercado Aurora y Central porque superan el límite de 2 mm de zona inhibida (considerado como positivo) en 100% de las muestras.

ANÁLISIS CUANTITATIVO:

A. RESULTADOS PARA SULFAMETOXAZOL:

Figura 3: Cromatogramas de (a) un estándar de sulfametoxazol con una concentración de 0.002mg/mL y de (b) una muestra de tejido muscular de pollo (pechuga) donde se aprecia el tiempo de retención.



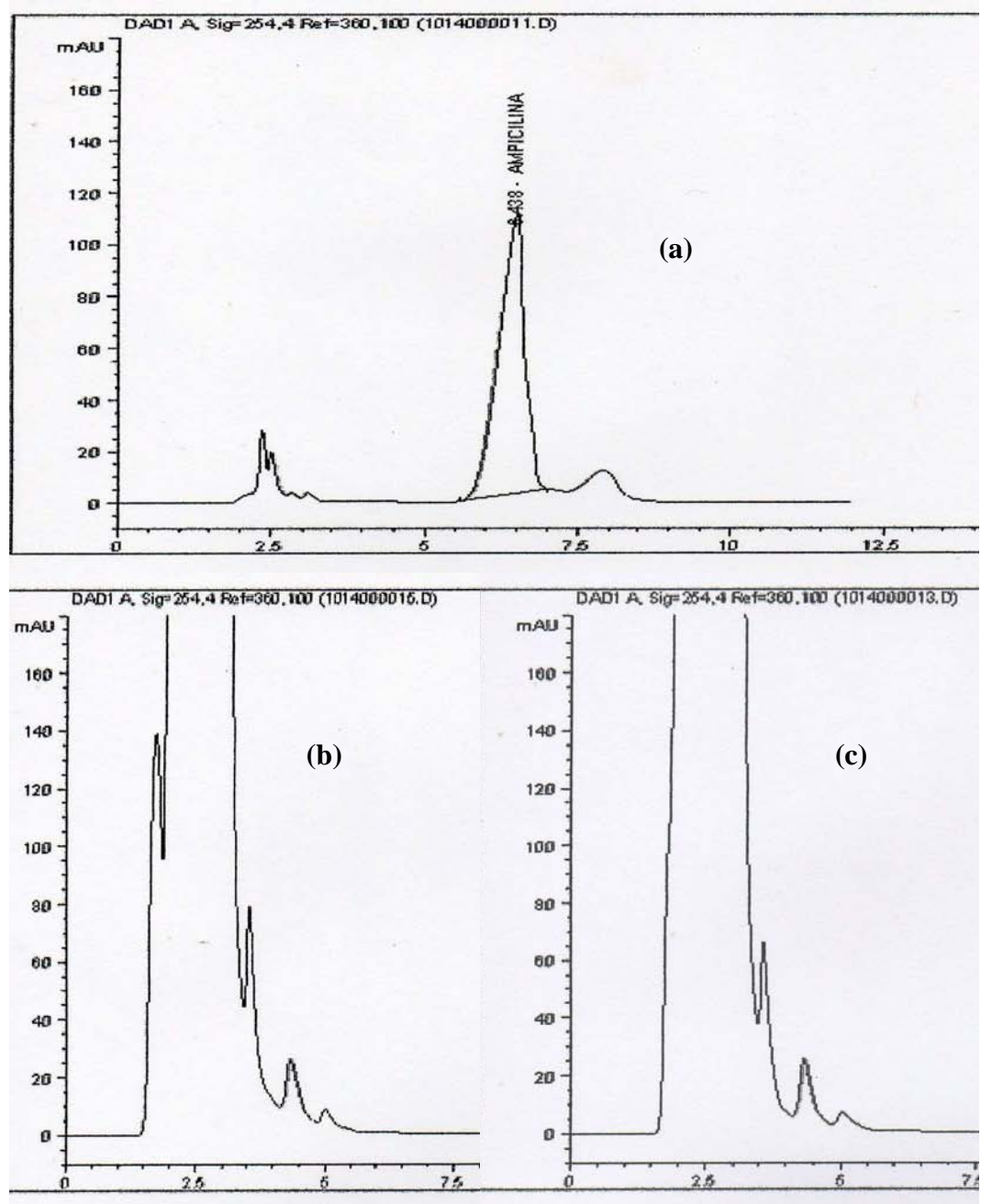
CUADRO N° 7: Cantidad de residuos de sulfametoxazol (ug/Kg) en la muestra ensayo comparada con el estándar de referencia.

ZONA DE MUESTREO	SULFAMETOXAZOL ug/Kg de músculo^(*)
Mercado Central	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 291.66 • Muestra 2 = 272.58
Mercado Aurora	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 247.58 • Muestra 2 = 242.24
Mercado Eco	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 154.44 • Muestra 2 = 159.00
Supermercado Metro	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 89.13 • Muestra 2 = 88.58

^(*)Ver anexo VIII

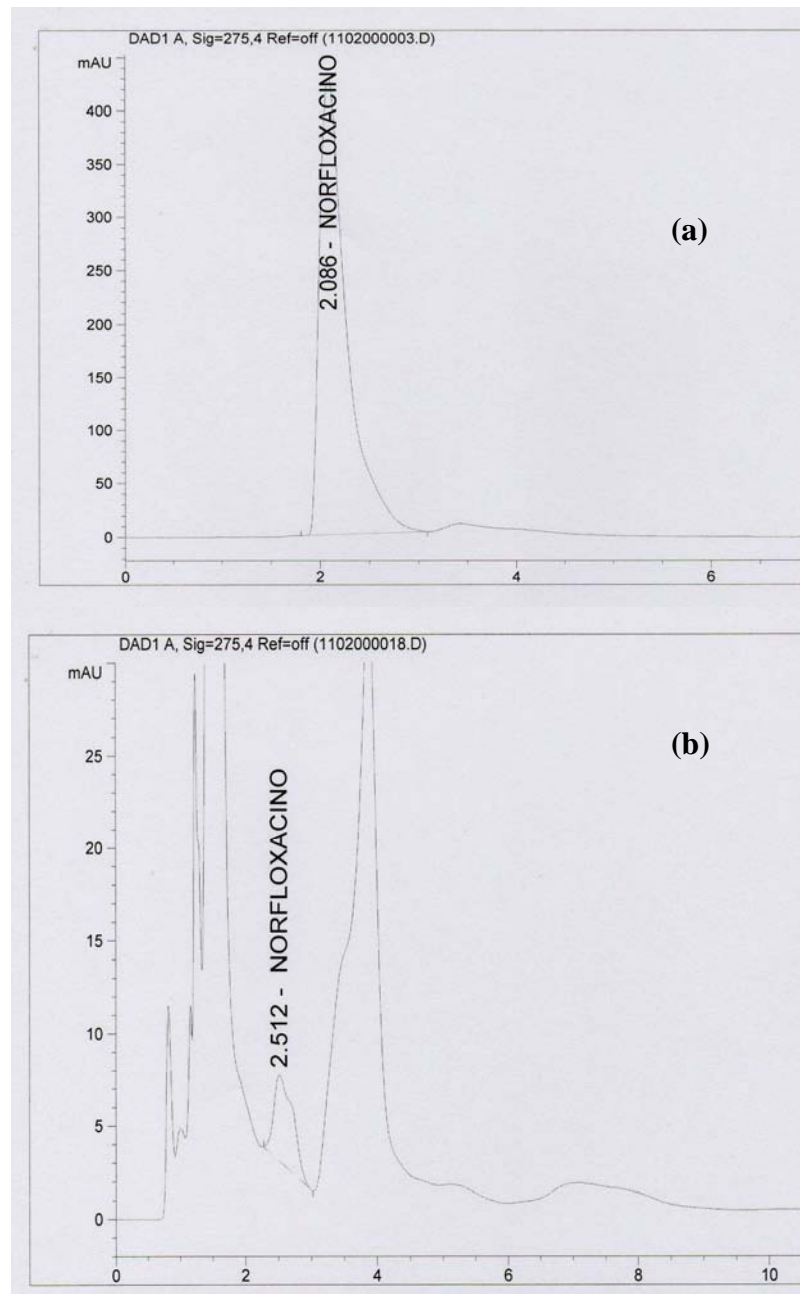
B. RESULTADOS PARA AMPICILINA: Los resultados para ampicilina no se pudieron calcular debido a que el tiempo de retención no fue el mismo para todas las muestras y difirió del estándar.

Figura 4: Cromatogramas de (a) un estándar de ampicilina con una concentración de 1mg/mL y de (b) (c) una muestra de tejido muscular de pollo (pechuga) donde se aprecia las diferencias del tiempo de retención.



C. RESULTADOS PARA NORFLOXACINO:

Figura 5: Cromatogramas de (a) un estándar de norfloxacinó con una concentración de 0.2mg/mL y de (b) una muestra de tejido muscular de pollo (pechuga) donde se aprecia el tiempo de retención.



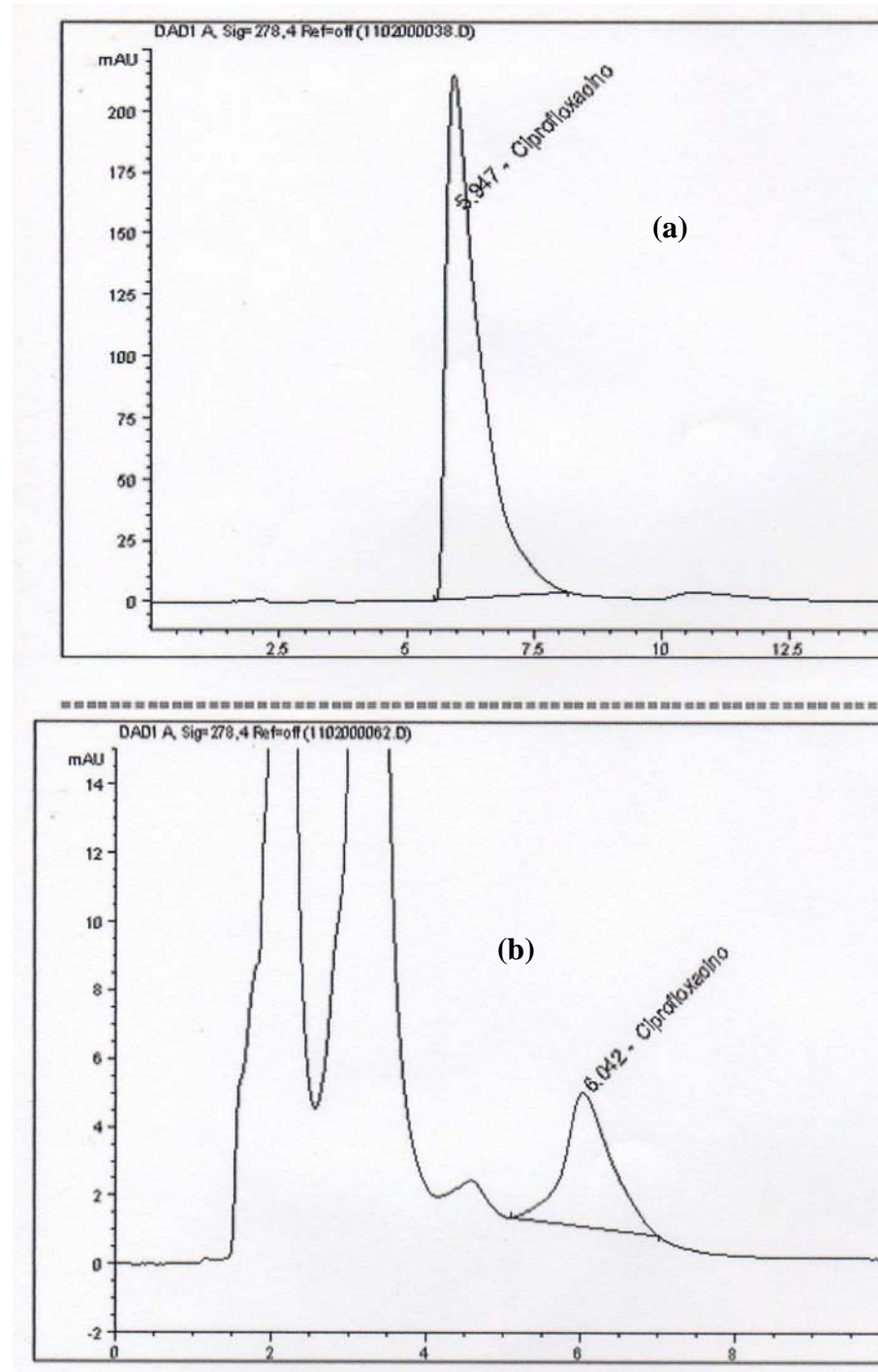
CUADRO N° 8: Cantidad de residuos de norfloxacinó (ug/Kg) en muestra ensayo comparada con el estándar de referencia.

ZONA DE MUESTREO	NORFLOXACINO ug/Kg músculo^(*)
Mercado Central	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 3318.90 • Muestra 2 = 3294.71
Mercado Aurora	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 3292.35 • Muestra 2 = 3208.72
Mercado Eco	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 2895.83 • Muestra 2 = 2799.76
Supermercado Metro	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 3119.99 • Muestra 2 = 2765.84

^(*)Ver anexo VIII

D. RESULTADOS PARA CIPROFLOXACINO:

Figura 6: Cromatogramas de (a) un estándar de ciprofloxacino con una concentración de 0.2mg/mL y de (b) una muestra de tejido muscular de pollo (pechuga) donde se aprecia el tiempo de retención:



CUADRO N° 9: Cantidad de residuos de ciprofloxacino (ug/Kg) en muestra ensayo comparada con el estándar de referencia:

ZONA DE MUESTREO	CIPROFLOXACINO ug/Kg músculo^(*)
Mercado Central	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 179.04 • Muestra 2 = 166.54
Mercado Aurora	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 150.79 • Muestra 2 = 133.29
Mercado Eco	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 0.00 • Muestra 2 = 0.00
Supermercado Metro	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra 1 = 0.00 • Muestra 2 = 0.00

^(*)Ver anexo VIII

IV. DISCUSIÓN :

En la primera etapa, el estudio demostró la existencia de grupos de antimicrobianos como los macrólidos y sulfamidas (cuadro N° 6) en 100% de las muestras analizadas de los mercados Aurora y Central obteniendo zonas de inhibición promedio de mínimo 2 y máximo 3.62 mm. Los resultados encontrados fueron similares a los descritos por Medina *et al*⁸ donde se obtuvieron resultados microbiológicos positivos en 66% de muestras de hígado en las placas de pH 7.2 para sulfamidas, a pesar de que no se trabajó con vísceras, el presente estudio utilizó el mismo método microbiológico para detectar residuos de antimicrobianos.

En la segunda etapa al observar los resultados por HPLC se puede decir que para sulfametoxazol (cuadro N° 7), norfloxacinó (cuadro N° 8) y ciprofloxacino (cuadro N° 9) la cantidad de residuos están fuera de los límites máximos permitidos por la Unión Europea, excepto la muestra cuantificada de supermercado Metro para el caso del sulfametoxazol ya que no pasa de los 100ug/Kg de músculo, permitidos para las sulfamidas en general (anexo VIII). En el caso de las muestras con residuos de norfloxacinó, estuvieron fuera de los límites permitidos el 100% de las muestras (cuadro N° 8) ya que para quinolonas de segunda generación no debe pasar de 100ug/kg de músculo tomado como valor máximo permitido (anexo VIII), observándose resultados de mínimo 2700ug/Kg y máximo 3300ug/kg; muy similar es el caso del ciprofloxacino donde los resultados también sobrepasan los límites máximos permitidos por la Unión Europea para las muestras de mercado Central y Aurora debido a que se obtuvieron resultados de mínimo 133 y máximo 179 ug/Kg . Estos resultados se pueden comparar con el trabajo de Molero-Saras *et al*¹⁰ donde obtuvieron 3810 ug/Kg de enrofloxacinó (quinolona de segunda generación) en pechuga de pollo, resultados que están por encima de los límites máximos permitidos por la Unión Europea. Como se puede apreciar, para el presente estudio se ha tomado como referencia el límite máximo permitido para la enrofloxacinó que es un quinolona de segunda generación al igual que el ciprofloxacino y norfloxacinó, los cuales se analizaron por ser muy utilizados en nuestro país en industria avícola al igual

que el sulfametoxazol. En el caso de la ampicilina no se pudo calcular cantidades de residuos, esto podría ser debido a que la técnica de extracción no fue la adecuada por lo que sería conveniente probar otro método.

Finalmente se observa que de los resultados del análisis microbiológico se comprobó la existencia de sulfametoxazol (sulfamida) por el método de HPLC, en el caso de los macrólidos no se realizó el análisis cuantitativo debido a que no tuvimos el método validado disponible para realizarlo. Seguidamente se analizó ciprofloxacino y norfloxacino (quinolonas) por tener el método por HPLC disponible para su análisis. Cabe destacar que el método microbiológico, utilizado para detectar los grupos de antimicrobianos, es el más accesible y de bajo presupuesto además de ser avalados por la Unión Europea. En cuanto al método por HPLC se considera que es relativamente caro pero es muy importante su utilización debido a que es altamente eficiente y sensible por los resultados que confirman la presencia y cantidad de antimicrobianos presentes en las muestras analizadas además de ser avalado por el codex alimentario. Por estas razones son muy usados en diferentes estudios como los mencionados anteriormente y muchos otros como el de Perez¹² donde se trabajó el método microbiológico de las cuatro placas y el de Pozo *et al*¹⁴ donde se trabajó el método cuantitativo por HPLC para análisis de sulfamidas en miel.

V. CONCLUSIONES:

- Se comprobó la presencia de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollos (pechuga) por medio del método microbiológico de difusión de las cuatro placas con rangos de zonas de inhibición entre 2 y 3.62 mm.
- De acuerdo a la cuantificación por HPLC se confirma la cantidad promedio de 227.92 ug/Kg para sulfametoxazol y un promedio de 3087.01 ug/Kg para norfloxacinó que sobrepasan los límites máximos de residuos permitidos por la Unión Europea para el 100% de las muestras de los cuatro mercados.
- La cantidad de residuo de ciprofloxacino sobrepasó los límites permitidos con un promedio de 157.42 ug/Kg para los mercados Central y Aurora.
- Finalmente se comprueba que el tiempo de espera para la eliminación de antimicrobianos no se cumple en las avícolas que proveen pollo a los cuatro mercados considerados para el estudio.

VI. RECOMENDACIONES:

- El Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA en coordinación con la Dirección General de Salud Ambiental DIGESA deben promover el estudio de residuos de antimicrobianos en carnes de consumo masivo para conocer si cumplen con las normas internacionales de sanidad alimentaria, en cuanto a límites máximos de residuos permitidos.
- El estudio de residuos antimicrobianos en carnes de consumo masivo debe realizarse utilizando métodos recomendados por libros oficiales como el Codex alimentarius, el cual cuenta con una relación de métodos validados para este tipo de análisis.
- En análisis futuros de residuos antimicrobianos es necesario tener en cuenta los tratamientos térmicos a los que son sometidos las carnes antes de ser consumidas para saber si dichos residuos sufren algún cambio en su estructura y concentración.
- Es necesario que los médicos veterinarios y empresas privadas mejoren las medidas de bioseguridad en las diferentes avícolas, prestando especial énfasis al uso adecuado de los antimicrobianos y al cumplimiento de los tiempos de espera.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ANADÓN A. Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública [Sede web]. España: racve.es; 2007 [actualizada 06 junio de 2009; acceso 10 de julio de 2009]. Disponible en: <http://www.racve.es>.
2. DíEZ P, CALDERÓN V. The Reveurs de Lange. Empleo de antibióticos en veterinaria [Serie en Internet]. 1999 [citado el 25 de marzo 2009]; 22(3). Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol22/suple3/pdf/26resi.pdf>
3. FERNANDEZ T. Técnicas microbiológicas de residuos inhibidores. [Serie en Internet]. 2007 [citado el 20 de diciembre de 2009]; 17(3). Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/959/95917304.pdf>
4. GONZÁLES H, ESPINOSA A, CUMPLIDO G, BERMÚDEZ M. Estabilidad de sulfametazina en carne y productos cárnicos de cerdo tratado térmicamente. Veterinaria México. 2004; 35(2):91-100.
5. KILINC B, MEYER C, HILGE V. Evaluation of the EEC four-plate test and Premi test for screening antibiotic residues in trout (*Salmo trutta*). International Journal of Food Science & Technology. 2007; 42(5):625-28.
6. MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J. Brock. Biología de los Microorganismos. 8ª Edición Revisada. Prentice Hall, Inc. Madrid: 2000.
7. MANGER J. PhD, ASBURY C. PhD, COLWELLI R, BRAVO R, BRADEN L, BRATER K, et al. Farmacopea de los Estados Unidos N°32. USP 32. Estados Unidos: 2009.

8. MEDINA M, GONZÁLES D y RAMÍREZ A. Detección de residuos antimicrobianos en tejidos comestibles y tetraciclinas en hueso de cerdo. Rev. Salud Anim. 2008; 30(2): 110-15.
9. MENDO M. Lecciones de Microbiología y Medios de Cultivo. Manual de laboratorio. 4ª Edición. Ediciones Laborales SRL.Lima: 1995
10. MOLERO-SARAS G, PÉREZ M, SÁNCHEZ A, MAVÁREZ DE SERRANO M, ASCANIO E, OVIEDO DE VALE M. Residuos de Enrofloxacin en Tejido Hepático y Muscular de Pollos Beneficiados en el Municipio San Francisco del Estado Zulia, Venezuela. Rev.Científica. 2006; 16(6): 629-33.
11. MONTALVO M, OLIVOS O, GILABERT S y RODRÍGUEZ A. Análisis del riesgo de los medicamentos veterinarios presentes en los alimentos. Rev. Actualidad en Farmacología y Terapéutica. 2004; 2(3):168-75.
12. PÉREZ J. Ensayos de familiarización en la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal por el método de las cuatro placas [tesina]: Buenos Aires: Universidad de Belgrano; 2005.
13. PÉREZ DE CIRIZA J, HUARTE A, SAIZ I, OZCÁRIZ M, PURROY M. Residuos de sustancias inhibidoras en carnes. [Serie en Internet]. ANALES.1999 [citado 12 enero 2009]. Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol22/suple3/suple26.html>
14. POZO J, MANQUIAN M, NEIRA M, MANSILLA R. Evaluación de un método de análisis de residuos de sulfamidas, en miel, por cromatografía líquida de alto rendimiento. Agro Sur. 2004; 32(2):87-93.

15. QUATTROCCHI O, ABELAIRA I, LABA R. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Merck; Buenos Aires:1992.
16. SENASA [Página principal de Internet]. Lima: Senasa Peru; 2010 [actualizado 01 de febrero 2010, citado 28 de febrero 2010]. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe/>
17. SERRANO D, Ph.D; Biodisponibilidad de los antimicrobianos en los nuevos sistemas de producción [sede Web]. Lima: Apavic.com; 2002 [actualizada 03 de enero de 2009; acceso 02 de febrero de 2009]. Disponible en: <http://www.apavic.com>.

ANEXOS

ANEXO I: GLOSARIO DE TÉRMINOS:

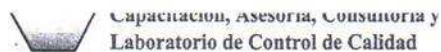
- 1. Bacillus:** Género de bacterias aerobias, gram-positivas, formadoras de esporas.
- 2. Elución:** Desplazamiento, por medio de un eluyente, de una sustancia fijada en una interfase.
- 3. Límite máximo de residuo (LMR):** Significa el límite máximo de residuo, el máximo nivel o tolerancia máxima para sustancias establecidas por la legislación de una comunidad. Expresado en ug/kg de tejido fresco, que puede aceptarse en un alimento como resultado del uso de un medicamento en animales destinados al consumo humano.
- 4. Método Cualitativo:** Significa método analítico el cual identifica una sustancia sobre la base de sus propiedades químicas, físicas o biológicas.
- 5. Método Cuantitativo:** Significa método analítico el cual determina la cantidad o la fracción de masa de una sustancia la cual puede ser expresada con un valor numérico de unidades apropiadas.
- 6. Micrococcus:** Género de bacterias gram-positivas de la familia Micrococcaceae, que se encuentran en el suelo, agua, etc.
- 7. Muestra fortificada:** Significa una muestra enriquecida con una cantidad conocida del analito a ser detectado.
- 8. Músculo esquelético** órgano formado por fibras cuya contracción produce el movimiento y asegura la resistencia a las fuerzas exteriores. También denominado: estriado, somático o voluntario. Es la carne de la carnicería.
- 9. Unidad Internacional (UI):** Actividad de un peso determinado de un preparado estándar internacional. Los métodos de valoración biológica se realizan comparando la actividad del preparado desconocido con la del preparado patrón, por medio de la respuesta biológica producida por ambas sustancias en condiciones estrictamente comparativas.
- 10. Zona de inhibición:** Área donde el desarrollo de las bacterias disminuyó o no ocurrió.

ANEXO II: Lista de sustancias farmacológicamente activas cuyos LMR se han establecido. Reglamento del Consejo Europeo 2758/99 (modificación del 23.12.99 del R2377/90)

Sustancia farmacológicamente activa	Especie animal	Límite máximo residual (µg/Kg) / Tejidos diana
QUIMIOTERAPÉUTICOS		
Sulfonamidas		
Todas las sustancias de este grupo	Todas las especies productoras de alimentos Bovinos, ovinos, caprinos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón 100 /leche
Derivados de la diaminopirimidina		
Baquiloprim	Bovinos	10 /grasa; 30 /leche; 150 /riñón; 300 /hígado
	Porcinos	40 /piel más grasa; 50 /hígado, riñón
Trimetoprim	Bovinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón, leche
	Porcinos	50 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Équidos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón
	Aves (no productoras de huevos para el consumo humano)	50 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Pescado	50 /músculo y piel en proporciones normales
ANTIBIÓTICOS		
Penicilinas		
Amoxicilin, ampicilina, bencilpenicilina	Todas las especies productoras de alimentos	4 /leche; 50 /músculo, grasa, hígado, riñón
Cloxacilina, docloxacilina, oxacilina	Todas las especies productoras de alimentos	30 /leche; 300 /músculo, grasa, hígado, riñón
Penetamato	Bovinos	4 /leche; 50 /músculo, grasa, hígado, riñón
	Porcinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón
Cefalosporinas		
Cefalexina	Bovinos	100/leche; 200/músculo, grasa, hígado; 1000/riñón
Cefazolina	Bovinos, ovinos, caprinos	50 /leche
Cefquinoma	Bovinos	20 /leche; 50 /músculo, grasa; 100 /hígado; 200 /riñón
	Porcinos	50 /músculo, piel y grasa; 100 hígado; 200/ riñón
Ceftiofur	Bovinos	100 leche; 1000 /músculo; 2000 grasa, hígado; 6000 riñón
	Porcinos	1000 /músculo; 2000 /grasa, hígado; 6000 /riñón
Quinolonas		
Danofloxacin	Bovinos (no productores de leche para el consumo humano)	30/leche; 100 grasa; 200 /músculo; 400 /hígado, riñón
	Porcinos	50 /piel y grasa; 100 /músculo; 200/hígado y riñón
	Pollo	100 /piel más grasa; 400 /hígado, riñón
Difloxacin	Pollo, pavo	300 /músculo; 400 /piel más grasa; 600/ riñón; 1900 /hígado
Enrofloxacin	Bovinos	100 /músculo, grasa, leche; 200 /riñón; 300 /hígado;
	Conejos	100 /músculo, grasa; 200 /hígado; 300 /riñón
	Porcinos	100 /músculo, piel más grasa; 200 /hígado; 300 /riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /músculo, piel más grasa; 200 /hígado; 300 riñón
	Ovinos	100 /músculo, grasa; 200 /riñón; 300 /hígado;
Flumequina	Bovinos, ovinos (no productores de leche de consumo)	200/músculo; 300/grasa; 500/hígado; 1500/riñón
	Porcinos	200/músculo; 300/piel y grasa; 500/hígado; 1500/riñón
	Pollo	250/piel y grasa; 400/músculo; 800/hígado; 1000/riñón
	Salmónidos	600/músculo y piel en proporciones normales
Sarafloxacin	Pollo	10 /piel más grasa, hígado
	Salmónidos	30 /músculo y piel en proporciones normales
Tiamulina	Porcinos	100/músculo; 500/hígado

Sustancia farmacológicamente activa	Especie animal	Límite máximo residual (µg/Kg) / Tejidos diana
Macrólidos		
Espiramicina	Bovinos	200 músculo, leche; 300 /grasa, hígado, riñón
	Porcinos	250 /músculo; 1000 /riñón; 2000 /hígado
	Pollo	200 /músculo; 300 /piel más grasa; 400 /hígado
Tilmicosina	Bovinos, ovinos, porcinos	50 /músculo, grasa; 1000 /hígado, riñón
	Ovinos	50 /leche
	Pollo	75 /músculo, piel más grasa; 250 /riñón; 1000 /hígado
Tilosina	Bovinos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón; 50 /leche
	Porcinos	100 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /piel más grasa, hígado, riñón
Fluorfenicol y compuestos asociados		
Florfenicol	Bovinos	200 /músculo; 300 /riñón; 3000 /hígado;
	Porcinos	300 /músculo; 500 /piel y grasa, riñón; 2000 /hígado
	Pollo	100 /músculo; 200 /piel y grasa; 750 /riñón; 2500 /hígado
Tianfenicol	Bovinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón, leche
	Pollo	50 /piel más grasa, hígado riñón
Tetraciclina		
Clortetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 /músculo y leche; 200/huevos; 300 /hígado; 600 /riñón
Doxiclina	Bovinos	100 /músculo; 300 hígado; 600 /riñón
	Porcinos	100 /músculo; 300 /piel más grasa, hígado; 600 /riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /músculo; 300 /piel más grasa, hígado; 600 /riñón
Oxitetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 /músculo, leche; 300 /hígado; 600 /riñón; 200 huevos
Tetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 músculo, leche; 300 /hígado; 600 /riñón; 200 /huevos
Ansamicina con anillo de naftaleno		
Rifaximina	Bovinos	60 /leche
Pleuromutilinas		
Valnemulina	Porcinos	50 /músculo; 100 /riñón; 500 /hígado
Lincosamidas		
Lincomicina	Bovinos	50/grasa; 100 /músculo; 150/leche; 500 /hígado; 1500 /riñón
Aminoglucósidos		
Apramicina	Bovinos	1000 /músculo, grasa; 10000 /hígado; 20000 /riñón
Otros antibióticos		
Novobiocina	Bovinos	50 /leche

ANEXO III: CERTIFICADOS ANALÍTICOS DE LAS BACTERIAS UTILIZADAS



CERTIFICACIÓN DE CEPA

Cepa : *Bacillus subtilis*

Procedencia y Clasificación : ATCC 6633

Lote del Liofilizado : 167303 (97-10SV)

Fecha de Vencimiento del Liofilizado : 2002-10

Fecha de apertura del liofilizado(*) : 2001-02-05


Fecha de Repique : 2007-10-27

Nº de Pasaje : Tercer Pasaje

Temperatura óptima de incubación : 32 – 35°C

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Tinción Gram	Bacilos rectos Gram Positivos. Presencia de esporas en cultivos viejos	Corresponde a la especificación
Características Culturales: - Cultivo en Agar Tripticosa de Soya	Colonias circulares o de bordes irregulares, ligeramente secas de color blanco	Corresponde a la especificación
Características bioquímicas: - Producción de Catalasa	Positivo	Positivo
- Producción de Lecitinasa	Negativo	Negativo
- Producción del Acido del Metabolismo de Glucosa	Positivo	Positivo
- Prueba de Voges Proskauer	Positivo	Positivo

(*) El liofilizado fue reconstituido y sembrado en medio líquido el 2001-02-05, antes de su fecha de vencimiento (2002-10). El desarrollo microbiano de los medios líquidos fue preservado en tanque criogénico con nitrógeno líquido para su posterior uso.


MSc. Mónica Tokushima M.
C.B.P. 595

ATCC™

American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110-2209 USA
Telephone: (703) 365-2700
Facsimile: (703) 365-2730

World Wide Web URL <http://www.atcc.org/>

Certificate of Analysis

PRODUCT: ATCC 6633 *Bacillus subtilis*
LOT: 167303 (97-10SV) **ORIGIN:** 1-84 LN, seed
EXPIRATION: 2002-10
CONCENTRATION: $>10^8$ cfu/vial **STORAGE:** +2°C to +8°C

PRODUCT DESCRIPTION: Bacterial cells freeze-dried in a menstroom of Trypticase Soy Broth plus bovine serum albumin Frac V and sucrose.

PURITY: Sample vials from this lot were opened into nonselective broth media and incubated for 48 hours. Plates were then inoculated and examined after growth, both visually and by staining methods, to check the purity of the culture.

NOTES:

1. Gram stain: Gram positive rods
2. The following biochemical reactions were recorded:

Catalase	Positive
Nitrate reduction	Positive
Voges-Proskauer	Positive
Acid from lactose, xylose	Negative
Acid from sucrose, glucose	Positive
Gelatinase	Positive

Date: June 30, 1998

Shirley D. Lee
Bacteriology Program



HYPATIA S.A.

Capacitación, Asesoría, Consultoría y
Laboratorio de Control de Calidad

CERTIFICACIÓN DE CEPA

Cepa : *Micrococcus luteus*

Procedencia y Clasificación : ATCC 9341

Lote del Liofilizado : 197094 (97-08SV)

Fecha de Vencimiento del Liofilizado : 2002-08

Fecha de apertura del liofilizado(*) : 2001-02-06


Fecha de Repique : 2007-10-27

Nº de Pasaje : Tercer Pasaje

Temperatura óptima de incubación : 30 – 35°C

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Tinción Gram	Cocos en tetradas Gram Positivos	Corresponde a la especificación
Características Culturales: - Cultivo en Agar Tripticosa de Soya	Colonias circulares convexas; algunas lisas, otras rugosas; pigmentadas de amarillo	Corresponde a la especificación
Características bioquímicas: - Producción de Catalasa	Positivo	Positivo
- Producción de Ureasa	Positivo	Positivo
- Producción de Gelatinasa	Positivo	Positivo

(*) El liofilizado fue reconstituido y sembrado en medio líquido el 2001-02-06, antes de su fecha de vencimiento (2002-08). El desarrollo microbiano de los medios líquidos fue preservado en tanque criogénico con nitrógeno líquido para su posterior uso.


MSc. Mónica Tokushima M.
C.B.P. 595

ATCC™

American Type Culture Collection
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20220-2209
FAX: (703)365-2730
Phone: (703)365-2700
World Wide Web URL <http://www.atcc.org/>

Certificate of Analysis

PRODUCT: ATCC 9341 *Micrococcus luteus*
LOT: 197094 (97-08SV) ORIGIN: 6-61 seed
EXPIRATION: 2002-08
CONCENTRATION: $>10^7$ cfu/vial STORAGE: +2°C to +8°C

PRODUCT DESCRIPTION: Bacterial cells freeze-dried in a menstruum of Trypticase Soy Broth plus bovine serum Frac V and sucrose.

PURITY: Sample vials from this lot were opened into nonselective broth media and incubated for 48 hours. Plates were then inoculated and examined after growth, both visually and by staining methods, to check the purity of the culture.

NOTES:

1. Gram stain: Gram positive cocci
2. Yellow-pigmented colonies
3. Two colony types exhibited: rough and smooth
4. The following biochemical reactions were recorded:

Urease	Positive
Acid from Purple Broth mannitol	Negative
NO ₃ reduction	Negative
Gelatinase	Positive

Date: September 17, 1998

Shirley D. Loh
Bacteriology Program

ANEXO IV: CERTIFICADOS ANALÍTICOS DE LOS ESTÁNDARES UTILIZADOS.

**PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE ESTÁNDAR SECUNDARIO
CONTROL DE CALIDAD**

PRODUCTO : AMPICILINA ANHIDRA		CÓDIGO : 00000001
N° DE ANALISIS : 0000001	LOTE N° : AMA-5040008	LÍNEA : FARMACÉUTICA
CANTIDAD : 2,000g (01 ENVASE)	PROVEEDOR ORIGINAL : VIRCHOW LIMITED PAÍS : INDIA	TÉCNICA N° : USP31 Pág. 1550,1551
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
1. DESCRIPCIÓN :	Polvo cristalino blanco o casi blanco, prácticamente inodoro	CONFORME
2. IDENTIFICACIÓN (I.R.) :	CORRESPONDE	CONFORME
3. PERDIDA DE PESO POR SECADO:	MÁXIMO 2%	0,15%
4. CONTENIDO TAL CUAL :	MAYOR A 900ug/mg	950 ug/mg
5. CONTENIDO BASE SECA :	900 -1050 ug/mg	989.29 ug/mg
CONDICIONES DE ALMACENAJE: Recipientes herméticamente cerrados, protegidos de la luz y la humedad.		
A-1 TEMPERATURA AMBIENTE		
ANALIZADO POR : M.CH.L	FECHA DE ANÁLISIS : 22-01-09	REANÁLISIS : ENERO 2010
CONTROL DE CALIDAD	DISPOSICIÓN : A P R O B A D O	

**PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE ESTÁNDAR SECUNDARIO
CONTROL DE CALIDAD**

PRODUCTO : SULFAMETOXAZOL		CÓDIGO : CP 1121
Nº DE ANALISIS : MP00076-06	LOTE Nº : 33131105	LÍNEA : CIPA
CANTIDAD : 2,000g (01 ENVASE)	PROVEEDOR ORIGINAL : VIRCHOW LIMITED PAÍS : INDIA	TÉCNICA Nº : USP31 Pág. 2213,3521
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
1. DESCRIPCIÓN :	Polvo cristalino blanco o casi blanco, prácticamente inodoro	CONFORME
2. IDENTIFICACIÓN (I.R.) :	CORRESPONDE	CONFORME
3. PERDIDA DE PESO POR SECADO:	MAXIMO 0,5%	0,15%
4. CONTENIDO TAL CUAL :	MAYOR A 98,5%	99,70%
5. CONTENIDO BASE SECA :	99,0 -101,0%	99,85%
CONDICIONES DE ALMACENAJE: Recipientes herméticamente cerrados, protegidos de la luz y la humedad.		
A-1 TEMPERATURA AMBIENTE		
ANALIZADO POR : G.AZAÑERO	FECHA DE ANÁLISIS : 22-02-08	REANÁLISIS : FEBRERO 2010
CONTROL DE CALIDAD	DISPOSICIÓN : A P R O B A D O	

**PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE ESTÁNDAR SECUNDARIO
CONTROL DE CALIDAD**

PRODUCTO : NORFLOXACINO		CÓDIGO : 00000002
N° DE ANALISIS : 0000002	LOTE N° : 331311789	LÍNEA : FARMACÉUTICA
CANTIDAD : 2,000g (01 ENVASE)	PROVEEDOR ORIGINAL : VIRCHOW LIMITED PAÍS : INDIA	TÉCNICA N° : USP31 Pág. 2213,3521
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
1. DESCRIPCIÓN :	Polvo cristalino blanco o casi blanco, prácticamente inodoro	CONFORME
2. IDENTIFICACIÓN (I.R.) :	CORRESPONDE	CONFORME
3. PERDIDA DE PESO POR SECADO:	MÁXIMO 0,5%	0,1%
4. CONTENIDO TAL CUAL :	MAYOR A 98,5%	98,99%
5. CONTENIDO BASE SECA :	99,0 -101,0%	99,78%
CONDICIONES DE ALMACENAJE: Recipientes herméticamente cerrados, protegidos de la luz y la humedad.		
A-1 TEMPERATURA AMBIENTE		
ANALIZADO POR : M.Ch.L	FECHA DE ANÁLISIS : 22-02-09	REANÁLISIS : FEBRERO 2010
CONTROL DE CALIDAD	DISPOSICIÓN : A P R O B A D O	

ANEXO V: FORMULA DEL AGAR UTILIZADO EN EL ANÁLISIS:

AGAR ANTIBIÓTICO N° 11, DIFCO BD:

Medio de cultivo para realizar el ensayo de difusión en placa con bacterias *B. subtilis* y *M. luteus*.

- Fórmula:

Extracto de carne	1,5g
Extracto de levadura	3,0g
Peptona pancreática de caseína	4,0g
Peptona pancreática de carne	6,0g
D(+) Glucosa	1,0g
Agar- agar	15,0g
Agua destilada	1000 mL

ANEXO VI: FOTOS DE LA REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS

ESTÁNDARES



MUESTRA FORTIFICADA - MUESTRA ENSAYO

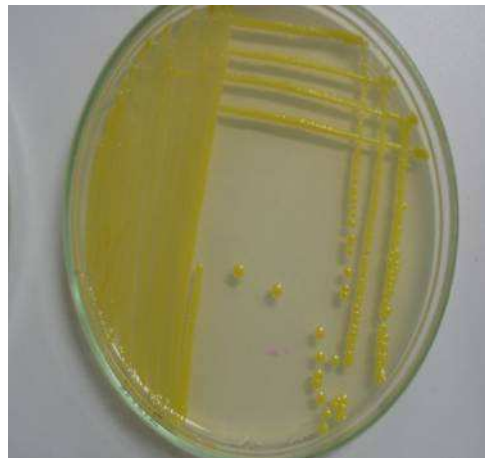


BACTERIAS

Bacillus subtilis



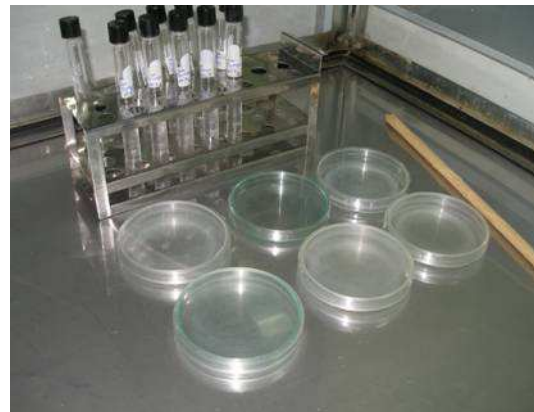
Micrococcus luteus



PREPARACIÓN DE MEDIOS



PREPARACIÓN DE PLACAS



EQUIPO HPLC UTILIZADO



PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA CUANTIFICAR



ANEXO VII: Cuadro de zonas de inhibición por microorganismo, pH y cantidad de muestras por zonas de muestreo.

MERCADO LA AURORA				
Nº de Muestra	<i>B.subtilis</i> pH 6	<i>B.subtilis</i> pH8	<i>M.luteus</i> pH8	<i>B.subtilis</i> pH 7.2
1	1/3	0/3	3/3	1/3
	x = 2,5mm	x = 0 mm	x = 3,9mm	x = 2,7mm
2	0/3	0/3	3/3	0/3
	x = 0mm	x = 0mm	x = 3,5mm	x = 0 mm
3	0/3	0/3	3/3	2/3
	x = 0mm	x = 0mm	x = 4,7mm	x = 2,5mm
4	0/3	0/3	3/3	1/3
	x = 0mm	x = 0mm	x = 4,0mm	x = 2.0mm
5	0/3	0/3	2/3	0/3
	x = 0mm	x = 0mm	x = 2,0mm	x = 0mm

MERCADO CENTRAL				
Nº de Muestra	B.S pH 6	B.S pH8	M.L pH8	B.S pH 7.2
1	5/5	4/5	3/5	2/3
	x = 2,7mm	x = 2,5mm	x = 3,3mm	x = 2,5mm
2	0/5	2/5	2/5	1/3
	x = 0mm	x = 3,0mm	x = 2,8mm	x = 2,2mm
3	0/5	0/5	1/5	2/3
	x = 0mm	x = 0mm	x = 2,5mm	x = 2,8mm
4	0/5	0/5	1/5	1/3
	x = 0mm	x = 0 mm	x = 2,5mm	x = 2,5 mm
5	0/5	0/5	1/5	0/3
	x = 0 mm	x = 0mm	x = 2,5mm	x = 0mm

MERCADO ECO				
N° de Muestra	B.S pH 6	B.S pH8	M.L pH8	B.S pH 7.2
1	3/5	0/5	4/4	2/5
	x =2,3mm	x = 0,0 mm	x =3,4mm	x =2,1mm
2	6/7	0/5	3/4	0/5
	x = 2,8 mm	x = 0,0 mm	x =2,8mm	x =0mm
3	0/7	0/5	3/5	0/7
	x = 0 mm	x = 0 mm	x =2,3mm	x = 0mm
4	0/5	1/5	0/5	2/5
	x = 0mm	x = 3,0 mm	x = 0mm	x =2.3mm
5	0/7	1/5	0/5	0/7
	x = 0mm	x = 2,0 mm	x = 0mm	x = 0 mm

SUPERMERCADO METRO				
N° de Muestra	B.S pH 6	B.S pH8	M.L pH8	B.S pH 7.2
1	2/5	0/5	0/5	1/5
	x =3,0mm	x = 0 mm	x = 0 mm	x = 3,1 mm
2	3/6	0/5	0/5	1/5
	x=2,2mm	x = 0mm	x = 0 mm	x = 2,3 mm
3	3/5	0/5	0/5	0/5
	x =2,7mm	x = 0mm	x = 0mm	x = 0 mm
4	0/5	0/5	0/5	0/5
	x = 0mm	x = 0 mm	x = 0mm	x = 0,0 mm
5	0/5	0/5	0/5	0/5
	x = 0mm	x = 0mm	x = 0mm	x = 0 mm

ANEXO VIII
REPORTES DE LA CUANTIFICACIÓN DE SULFAMETOXAZOL,
NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO